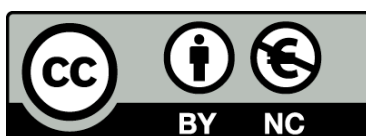




UNIVERSITAT<sub>DE</sub>  
BARCELONA

## **Papel de proteínas de la familia Bcl-2 en el estrés metabólico. Implicación en cáncer y en daño neuronal por isquemia**

Javier Jesús Galindo Moreno



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial 4.0. Espanya de Creative Commons**.

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial 4.0. España de Creative Commons**.

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0. Spain License**.



Tesis doctoral de la Facultat de Medicina, Universidad de Barcelona.

Programa de Doctorado en Biomedicina

**Papel de proteínas de la familia Bcl-2 en el estrés metabólico.**

**Implicación en cáncer y en daño neuronal por isquemia**

Javier Jesús Galindo Moreno

Directora de la tesis:

Dra. Cristina Muñoz Pinedo

Barcelona, 2015



La presente tesis doctoral: “Papel de proteínas de la familia Bcl-2 en el estrés metabólico. Implicación en cáncer y en daño neuronal por isquemia”, ha sido realizada en el instituto de Investigación Biomédica de Bellvitge y financiada por la Asociación para la investigación internacional en cáncer (AICR), por el Fondo de Investigaciones Sanitarias de España (08-0621) y por La Fundació La Marató de TV3 (111630/31).



INSTITUT  
D'INVESTIGACIÓ  
BIOMÈDICA DE  
BELLVITGE



**Fundació**  
**La Marató de TV3**





Aunque tan sólo han sido tres años trabajando en este trocito de conocimiento científico que por fin puedo brindar a la comunidad, hoy no quiero reducir mis pensamientos solamente a las personas que me han estado acompañando en ese rocambolesco proyecto de vida. No, no sería justo. Hoy recapitulo para tener sinceras palabras para todas aquellas personas que me han ayudado voluntaria o involuntariamente para conseguir este hito en mi vida. Lamentablemente para mí, pero por el bien de los valientes que lean este apartado de la tesis, reduciré considerablemente el rango de alcance mi bendita verborrea andaluza.

Mi familia, toda mi familia. Probablemente la cosa de la que más orgulloso me siento. No hay palabras para poder describir cuánto les debo a todos ellos. Han sabido inculcarme los valores morales de que la familia es lo más importante y siempre es lo primero. Los Galindo y nuestros domingos, y los Moreno y nuestras migas. Siempre hay humor, sabiduría, cariño y amor. Eso queda para mí, para siempre. Por eso, quería comenzar con vosotros. Gracias.

A mis padres, por la educación que me han dado y la integridad que me inculcaron. Sin sus valores nunca habría podido perseverar ante las muchas adversidades que la vida plantea. Vosotros que me dado la libertad para salir y explorar, perderme y fracasar, haciéndome saber que siempre podía volver para pedir ayuda. Papá, tú me enseñaste a pensar y reflexionar porque todas acciones tienen consecuencias y, aunque tú no lo sabes, me diste la pasión por la ciencia en un viaje en coche por los pirineos. Mamá, tú me has enseñado a reír y a hacer reír, a llorar por lo que merece la pena y olvidar lo que no la merece. Me has enseñado a amar como nunca he visto a nadie hacerlo. Por eso soy cómo soy, porque tengo lo mejor de vosotros. No tengo palabras de agradecimiento suficientes para vosotros. Os lo debo todo. Mil gracias. Os quiero.

A mi hermano, porque siempre has sido un modelo para mí. Porque somos tan parecidos y tan opuestos a la vez que sobran las palabras. Tú que siempre me has enseñado todo lo que sabías y me has obligado a esforzarme al máximo para poder competir contigo. Descubriéndome siempre el siguiente paso, empujándome siempre a dar el salto. Tú has forjado gran parte del Enano que ahora soy. Mil gracias por todo, por aguantarme y quererme aún cuando no te lo he puesto nada fácil.

A Lorena, mi compañera de vida. Entraste sin llamar, y lo hiciste para quedarte. Garantizas mi sonrisa y mi alegría, avalas mis ganas de avanzar en este camino que día a día y año a año, hemos ido recorriendo... Llegaste a mi vida como un huracán, la pusiste toda patas arriba e hiciste tambalear mis más profundos cimientos. Pero te quedaste para recoger. Una noche, en el Covadonga de nuestra historia, te dije dónde quería ir esa misma noche. Hoy, ya con el abismo del horizonte delante, te lo repito: “Donde sea, pero contigo”.

Al “Agüelo” porque no me perdonaría llamarlo abuelo, él no. Eres una de las personas que más admiro, eres uno de los focos que aún alumbran mi camino, espero que nunca pierda tu luz. Siempre nos dijiste “Haced familia” y eso hemos hecho. A ti te debemos los valores de que la familia es lo más sagrado y bonito que existe. Todo el que entra queda fascinado por tu legado y porque pase lo que pase, sabemos que *No estamos solos*. Sabes que dónde yo esté, tienes una bota de vino fresquita para el aperitivillo.

A mis abuelos, los que nos criaron como a sus últimos hijos. Hoy escribo una tesis porque os empeñasteis en comprar libros aún cuando en vuestra casa nunca los hubo, porque os machacásteis para que vuestros hijos estudiaran y fueran lo que quisieran en la vida y porque supisteis criarnos en la humildad y el trabajo. No sólo quiero agradeceros el cariño y la confianza siempre plena que habéis demostrado en vuestros nietos, sino que también quiero aprovechar para disculparme por todos los quebraderos de cabeza que tiene el soportar a un crío tan malvadamente original y siempre lo hicisteis con una paciencia sobrehumana. Os quiero.

A Cristina, por supuesto. Por la confianza depositada en mí desde un principio, por creer en mí en los malos momentos y por seguir luchando en la “Tesis contrarreloj” que tanto miedo nos daba. Aquí está, lo hemos conseguido. Ha sido una experiencia genial aprender de tu contagiosa pasión por la ciencia. Gracias por ser tan sumamente paciente con mis despistes y olvidos (imagina lo que sufren Lorena y mis padres). En todo este tiempo trabajando juntos solamente ha habido una cosa que me ha molestado y te la he dicho unas cuantas veces. Hoy te pido por favor que no vuelva a pasar, no vuelvas a dejar que la ciencia te apriete tanto como para perder la sonrisa. Fue tu carcajada al teléfono la que me hizo venirme corriendo desde Granada. A Isabel Fabregat por aceptar sonrientemente ser la tutora de mi trabajo y estar siempre dispuesta a ayudar.

A todos los CMPs, que como grupo me ha hecho entender que el trabajo de un grupo es mucho más que el trabajo de todos sus componentes. Trabajar con vosotros ha sido, de verdad que sí, una experiencia de lo más instructiva y gratificante.

A Raffaella, mi primera compañera de trabajo. Por acogerme y enseñarme a manejar a BALP (por si pensabas que la bautizamos para nada y que no iba a aparecer esta palabra en la tesis). Raffaella, eres la bondad hecha persona, muchas gracias por tu generosidad conmigo. Por tu infinita disposición para ayudar, por tu buen hacer y por tu sonrisa siempre presta. Recuerdo una anécdota realmente graciosa cuando volviendo de Chipre...*Grazie mille*.

Dídac, mil millones de gracias por aguantarme. Sé que no ha sido fácil. Me has enseñado a enseñar y espero haber aprendido. Hoy he de agradecerte más que a nadie el esfuerzo y la entrega que has demostrado con el proyecto. Todo el mundo sabe (y si no, ahora sí) que sin ti yo hoy no podría estar defendiendo la tesis. Nunca bajes la guardia, no te relajes. Si estás alerta podrás llegar donde quieras. Tú eliges.

Mi querida tropical, muchas gracias por todo. Gracias Clara, por tus conversaciones, por tu sinceridad siempre extrema y tus certeras patadas. Por tu crítica sincera y sin edulcorar. Esa misma sinceridad que al principio vi como un defecto, aún siendo tu mayor virtud. Nunca cambies, pelea duro, como siempre has hecho, de frente y sin trampas. Me siento muy orgulloso de haber compartido la autofagia contigo. Un duro paréntesis en mi tesis que ha servido para enseñarme más que todo el resto de mi estancia aquí. Ha sido un placer firmar en tu artículo.

Estefanía, llegaste demasiado tarde y te vas demasiado pronto. Me alegra haber tenido la oportunidad de compartir poyata y bata contigo. Mil millones de gracias por tu infinita paciencia en la lectura interminable de esta tesis. Creo que no te haces idea de lo fácil que ha sido escribir la tesis sabiendo que siempre estabas detrás. Gracias por ponerle comas a mi vida.

Cuando llegué a Barcelona, Nadia, tú me enseñaste todo lo que necesitaba para poner a BALP en su sitio. Aprendí muchísimo y lo pasé en grande hablando inglés, francés y catalán todo en la misma frase. Maravilloso. No nos olvidamos de tu paso por los CMPs.

Silvia, tu me has enseñado muchísimo más de lo que puedes imaginar. Muchas gracias.

Al COM, un departamento único en su especie. Hacéis que hacer la tesis sea más llevadero.

Gracias a todo el grupo de Mariona incluyéndote a ti misma, por supuesto. Habéis hecho que me haya vuelto un poco más loco de lo que estaba, pero teniendo en cuenta lo bien que lo hemos pasado...ha merecido la pena. Gràcies Adriana i Helena. Sense vosaltres ara no podria parlar res a català. Sense vosaltres no podria parlar res en català (ho confesso, he comprovat que està ben escrit). Angulo, gracias por ser tan sumamente autentica. Gracias Íñigo, porque siempre quise un hermano pequeño. Fonsi, Monelli, Gabi

IFs, a vosotros debo agradecerlos mucho pues me ayudasteis y acogisteis cuando peor lo pasaba, cuando más lo necesitaba. Joan, tu me has enseñado dos cosas fundamentales: que en el parque Joan Miró no hay ningún “Chusco” y que los catalanes (con entrenamiento), podéis abrazar tan *molt abrasagut* como cualquier otro. Recíprocas palabras te omito yo

también, porque como bien dices...no cal. Los momentos más divertidos del COM tienen la firma de tus chistes malos, así que...gracias. Judit, gracias por estar siempre ahí, gracias a ti: I don't forget to smile. Gracias también a Joaquim, por auténtico a Eva por ayudarme en la gymkana "Deposita una tesis" a Edgar por tus historias y a Dani por tu alegría y buen rollo. Magdiel, gracias por tu soberana honradez, tu cariño y sinceridad. Marta y Pep, por acogerme recién llegado y hacer que me integrara. Muchas gracias.

Óscar por poco no acabamos cruzando caminos! Sinceramente, me alegro mucho de compartir tantas conversaciones contigo, porque aceptemoslo: "El fútbol es la cosa más importante de las cosas poco importantes". Ahh, una altra cosa, accepta-ho, el guardiolismono tornarà mai. David y Santi, "los posdocs" gracias por llegar aportando sabiduría y sobre todo mucha, muchísima alegría y ganas de tomar algo. David, tu piloto se va, pero me llevo la copia de las llaves, no sufras. Laura fuiste la Mejide del COM pero lo pasamos francamente bien, ¿no? A Miguelico Saiz, (Saiiiiiiz). Gracias porque contigo (y con tu vídeo) me lo he pasado como un niño chico. Juan, me has hecho reir y pasar vergüenza casi a partes iguales, y no sé exactamente cómo, lo digo como un cumplido. Silvia sigue tan cuqui como siempre, el COM te lo agradece.

Javi Gallu, me alegro muchísimo de que pasaras por el COM aunque fuese poco tiempo, porque fue suficiente para conocerte y hacerme amigo tuyo. Gracias por la implacable sensatez de tus palabras y por enseñarme que hay curro después del I+D. Antonia, como ya te dije, voy a echar de menos tu bipolaridad y tus berridos, pero seguro que lo que más echaré de menos son tus consejos. Gracias por cuidar de todos.

Papa Giulio, gracias por todo. Tus comentarios ácidos, tus críticas demoledoras, tu conocimiento y tu True blot. Antonio, Sandra, Ferran, Costanza y Natalie ha sido un placer (bueno, a veces no tanto...) compartir journal clubs con vosotros.

Andreas (él y ella), Dani, Miriam, Roser, Daniel, Jitka...y tantos otros nombres que debo pasar por alto, muchas gracias. A todos, de verdad, muchas gracias.

A los amigos que la vida y la crisis me han ido repartiendo estratégicamente por ciudades de todo el mundo. Oscuro, has estado a mi lado siempre sin importar qué pasara ni por qué pasara. Me has defendido a brazo partido en los peores momentos. Mil gracias. Saluda a Java y Jacinta, diles que me acuerdo mucho de ellas. Ha sido un placer crecer a tu lado Paco. Juntos hemos pasado más de media vida. Besi mil gracias por tu bondad y tu cariño. Eres un ejemplo de esfuerzo y dedicación. Gracias por todo. Calculín y Bucólico, con vosotros he pasado los mejores momentos en Granada. Calcu, gracias por darme una

segunda oportunidad en Novatadas, y Buc, muchísimas gracias por decirme siempre la verdad, sobre todo cuando más dolía.

A los Juanes!! Me hicisteis apasionarme por la carrera en el contexto menos académico posible. El crucero está marcado a fuego en mi tan frágil memoria. Fueron dos años increíbles los que pasamos juntos. Gracias.

Por último, ralampagueo los nombres que han estado en mi mente mientras pensaba cómo lo he hecho para acabar haciendo ciencia en Barcelona que firma este libro. A todos ellos gracias porque de manera directa o indirecta, voluntaria o no habéis contribuido a que hoy esta tesis sea posible. A Don Rafael, porque hiciste una muesca única en mi carácter, A Juanlu que me enseñaste a perder una y otra vez a Magán y Benito porque me enseñasteis que siempre se pueden resolver los problemas de formas originales, con sacrificios, celadas y mates imposibles. La vida es ajedrez.



**A mi padre, a mi madre.**

Su legado, mi tesoro: profundas raíces y enormes alas.





Resumen .....	19
Abreviaturas .....	23
I. Introducción .....	27
1. Muerte celular.....	29
1.1. Apoptosis.....	29
1.1.1. Caspasas.....	30
1.1.2. Rutas de activación.....	32
1.2. Necrosis.....	34
1.2.1. Muerte por apertura del poro de permeabilidad transitoria mitocondrial (PPTM).....	35
1.2.2. Necroptosis.....	36
1.2.3. Ferroptosis.....	39
1.3. Muerte autofágica.....	40
1.3.1. Proceso autofágico.....	41
1.3.2. Regulación de la autofagia.....	42
2. Proteínas de la familia Bcl-2.....	44
2.1. Clasificación.....	45
2.2. Relación con apoptosis.....	46
2.3. Relevancia en cáncer.....	48
2.4. Relevancia en isquemia cerebral.....	49
2.4.1. Bcl-2.....	49
2.4.2. Bcl-xL.....	50
2.4.3. Mcl-1.....	50
3. Apolipoproteínas L.....	52
3.1. Relación con muerte celular.....	52
3.2. Relación con las proteínas Bcl-2.....	52
3.3. Relación con autofagia.....	53
4. Isquemia cerebral.....	54
4.1. Etiología y tratamiento.....	54

4.2. Descripción molecular de la cascada isquémica. ....	56
4.2.1. Caída de ATP. ....	56
4.2.2. Aumento del estrés oxidativo. ....	56
4.2.3. Excitotoxicidad. ....	58
4.3. Modelos empleados en bibliografía y sus conclusiones. ....	60
II. Hipótesis. ....	65
III. Objetivos. ....	69
IV. Materiales y métodos. ....	73
1. Mantenimiento de la colonia y cruces F1. ....	75
1.1. Aislamiento y cultivo de neuronas. ....	75
2. Líneas Celulares. ....	77
3. Tratamientos. ....	78
3.1. Tratamiento de retirada de glucosa. ....	78
3.2. Tratamiento de retirada de nutrientes y factores. ....	79
3.3. Tratamientos con fármacos. ....	79
3.4. Inducción de hipoxia. ....	80
4. Viabilidad celular. ....	80
4.1. Test de viabilidad celular. ....	80
4.2. Cristal Violeta. ....	81
4.3. Medida de muerte total. ....	81
4.4. Western Blot. ....	82
5. Inmunoprecipitación. ....	84
6. Inmunocitoquímica. ....	84
7. Transfecciones. ....	85
7.1. Transformación de bacterias y purificación de ADN plasmídico. ....	85
7.2. Transfección de plásmidos. ....	86
7.3. Transfección con siRNA. ....	87
8. Estadística. ....	87
9. Tablas. ....	88

V. Resultados .....	95
1. Generación de HMM y búsqueda de BH3-only. ....	97
2. Identificación de ApoL2 como proteína BH3-only ubicua.....	99
3. Localización de ApoL2 en HeLa. ....	101
4. ApoL2 no protege frente a la muerte inducida por IFN- $\gamma$ en HeLa.....	102
5. ApoL2 no es una proteína BH3-only.....	104
5.1. La sobreexpresión de ApoL2 no induce muerte ni protege las células HeLa frente a la sobreexpresión de BH3-only.....	104
5.2. El silenciamiento de ApoL2 no protege ni sensibiliza frente a diversos estímulos de muerte en HeLa.....	107
6. ApoL2 interacciona levemente con Bcl-2.....	108
6.1. ApoL2 no influye en la muerte por ABT-737.....	110
6.2. ApoL2 no regula el ciclo celular.....	110
6.3. ApoL2 podría regular la autofagia basal pero no la inducida.....	111
7. Efectos de la privación de oxígeno y glucosa (OGD) en neuronas corticales de embriones de ratón.....	113
7.1. Alteraciones moleculares inducidas por OGD.....	113
8. Noxa interviene en la muerte inducida por OGD.....	115
9. La muerte por OGD/R no se debe principalmente a la apoptosis.....	117
9.1. Los inhibidores de caspasas no protegen frente a OGD/R.....	117
9.2. No encontramos evidencias de activación de caspasas.....	119
10. Caracterización de los efectos producidos por diferentes tampones OGD.....	120
11. La muerte por OGD/R tiene un componente necrótico.....	123
11.1. La inhibición de la apertura del PPTM protege de la isquemia.....	123
11.2. En la muerte inducida por OGD/R también participa la necroptosis.....	126
11.3. La protección de CsA y necrostatina-1 no son aditivas.....	127
11.4. No hay evidencias de ferroptosis en nuestro modelo de OGD/R.....	128

12. Respuesta ante la de falta de nutrientes. ....	128
12.1. Papel de la autofagia en OGD/R .....	128
12.2. Caracterización de la vía mTOR en OGD/R. ....	130
VI. Discusión.....	135
Apolipoproteína L2 como posible proteína BH3-only .....	137
Domino BH3.....	137
Apolipoproteínas L y muerte celular. ....	138
Rol antiapoptótico de ApoL2.....	139
ApoL2 interacciona débilmente con Bcl-2 .....	140
Posible papel de ApoL2 en autofagia. ....	141
Isquemia cerebral en la actualidad.....	142
Papel de las proteínas Bcl-2 en isquemia.....	142
Papel del poro de permeabilidad transitoria de la membrana .....	144
Contribución de la necroptosis a la muerte inducida por la isquemia. ....	145
Papel del calcio. ....	146
Papel de los receptores de glutamato y de los ROS en isquemia.....	147
Papel de la autofagia mTOR en la neurodegeneración asociada a la isquemia/reperfusión. ....	148
Dianas combinadas .....	149
VII. Conclusiones.....	153
VIII. Bibliografía.....	157
IX. Anexo .....	173





## **Resumen**





Las proteínas de la familia Bcl-2 son un amplio grupo de proteínas cuya función más caracterizada es la de la regulación de la apoptosis a nivel mitocondrial. La alteración de los niveles o actividad de estas proteínas han sido relacionadas con multitud de dolencias como el cáncer o la neurodegeneración inducida por ictus.

En nuestro laboratorio hemos caracterizado las posibles funciones de la proteína ApoL2, una proteína que contiene un dominio BH3 y que podría pertenecer al grupo de las proteínas BH3-only. Los resultados indican que esta proteína no se comporta como una proteína BH3-only canónica, y que si tiene algún papel en la regulación de la muerte celular, ha de ser dependiente del estímulo y del tipo celular. Como otras proteínas Bcl-2, ApoL2 podría regular la autofagia basal en HeLa, pero son necesarios más experimentos para concluir tal cosa.

Por otro lado, hemos caracterizado el tipo de muerte celular inducida en neuronas corticales de ratón por la falta de nutrientes y factores tróficos en hipoxia. En este modelo isquémico, hemos comprobado que la apoptosis no es parte fundamental en la muerte neuronal masiva producida tras el tratamiento. Hemos comprobado en cambio que Noxa, una proteína de la familia Bcl-2 del grupo de las proteínas BH3-only, es fundamental en la muerte tras la retirada de nutrientes y factores tróficos en hipoxia aunque no hemos podido explicar el mecanismo de actuación de esta proteína por el que induce la muerte celular.

Hemos comprobado que la administración del inhibidor de la necroptosis, necrostatina-1, puede recuperar la viabilidad celular tras el tratamiento isquémico. Por último, también hemos descrito un efecto neuroprotector similar mediante la administración del inhibidor de la apertura del poro de permeabilidad transitoria mitocondrial, ciclosporina A. La similitud en la protección nos hace sospechar que quizás ambas drogas puedan estar afectando la misma ruta de señalización. No obstante, es necesaria la realización de nuevos experimentos para poder concluir o desmentir dicha hipótesis.

La muerte inducida por el tratamiento isquémico, parece ser multifactorial, ya que encontramos diferentes poblaciones que mueren por vías de señalización distintas.

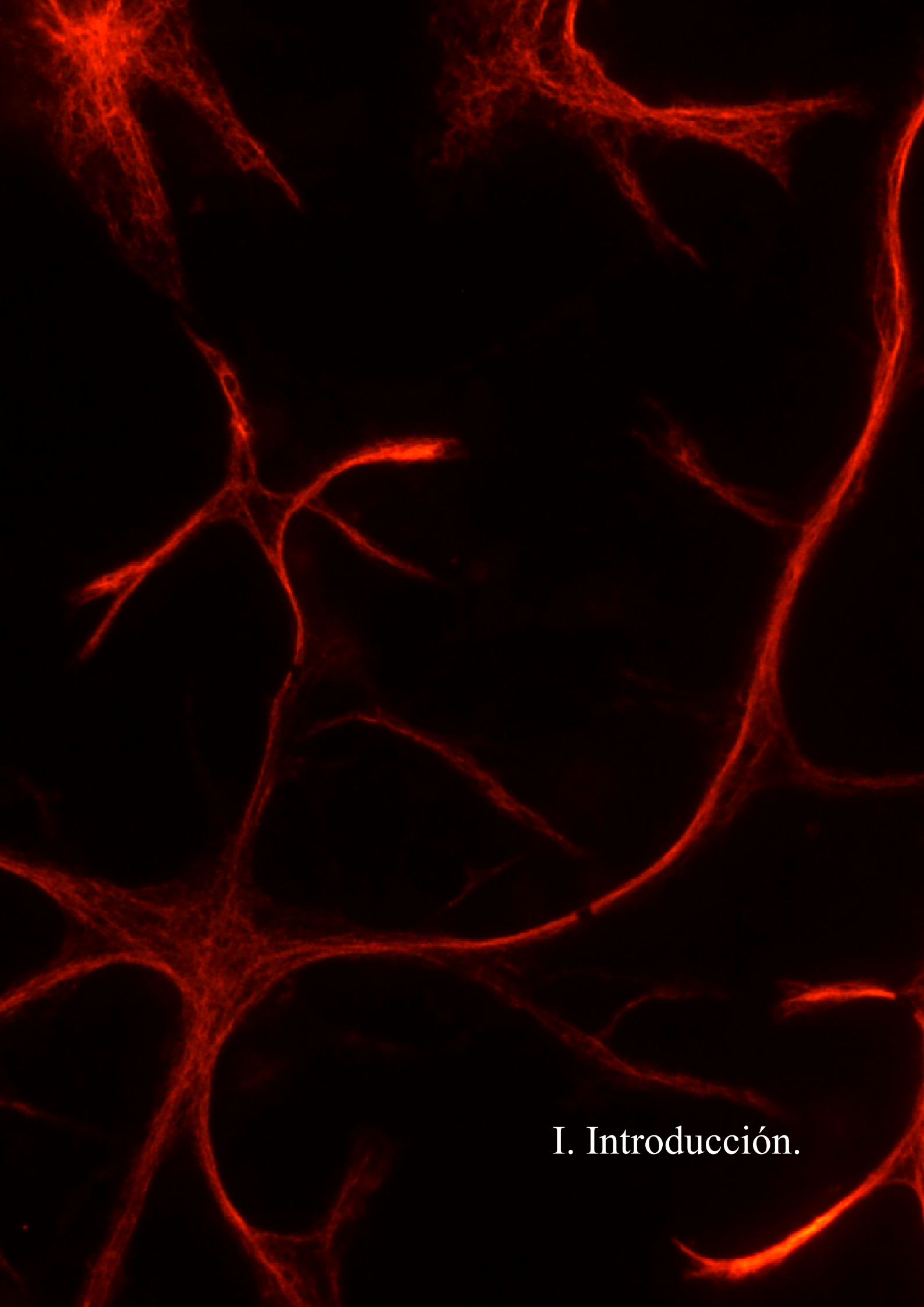


## **Abreviaturas**



Abreviatura	Significado
<b>3-MA</b>	3-Metiladenina
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico.
<b>Apaf-1</b>	<i>Apoptotic protease-activating factor</i> . Factor apoptótico activador de caspasas
<b>ATP</b>	<i>Adenosine TriPhosphate</i> . Adenosín trifosfato.
<b>BH</b>	<i>Bcl-2 Homology</i> . Dominio homólogo a Bcl-2
<b>CARD</b>	<i>Caspase Recruitment Domain</i> . Dominio de unión a caspasas
<b>CpD</b>	Proteína ciclofilina D
<b>CsA</b>	Ciclosporina
<b>DED</b>	<i>Death Effector Domain</i> . Dominio efector de muerte.
<b>DISC</b>	<i>Death Inducing Signaling Complex</i> . Complejo de señalización inductor de muerte
<b>DMSO</b>	Dimetil Sulfóxido.
<b>FADD</b>	<i>FAS-Associated Death Domain protein</i> . Proteína asociada a Fas con dominio de muerte
<b>GFP</b>	<i>Green Fluorescent Protein</i> . Proteína fluorescente verde.
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrógeno
<b>I/R</b>	Isquemia / Reperfusión
<b>IFN</b>	Interferón
<b>MCAO</b>	<i>Middel Cerebral Artery Occlusion</i> . Oclusión de la arteria central cerebral
<b>MEF</b>	<i>Mouse Embryonic Fibroblast</i> . Fibroblastos de embriones de ratón.
<b>MME</b>	Membrana Mitocondrial Externa
<b>MMI</b>	Membrana Mitocondrial Interna
<b>mTOR</b>	<i>mammalian Target Of Rapamycin</i> . Diana de la rapamicina en mamíferos
<b>NOS</b>	<i>Nitric Oxide Synthase</i> . Óxido nítrico sintasa.
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Anión superóxido
<b>OGD</b>	<i>Oxygen-Glucose Deprivation</i> . Privación de oxígeno y glucosa
<b>OGD/R</b>	OGD / Recuperación
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>ONOO-</b>	Anión peroxinitrito
<b>PPTM</b>	Poro de Permeabilidad de Transición Mitocondrial
<b>REDOX</b>	Reducción/Oxidación
<b>RIPK3</b>	<i>Receptor-Interacting Protein Kinase</i> . Proteína quinasa de interacción del receptor
<b>ROS</b>	Radicales libres del Oxígeno
<b>S.E.M</b>	Error estándar de la media
<b>SNC</b>	Sistema Nervioso Central
<b>STS</b>	Staurosporina
<b>TLR</b>	<i>Toll Like Receptor</i> . Receptor similar a Toll
<b>TNF</b>	<i>Tumoral Necrosis Factor</i> . Factor de necrosis tumoral.
<b>t-PA</b>	Activador tisular del plasminógeno
<b>TRADD</b>	<i>TNFR-Associated Death Domain protein</i> . Proteína asociada a TNFR con dominio de muerte
<b>WT</b>	<i>Wild Type</i>
<b>PARP</b>	<i>Poly (ADP-ribose) polymerase</i> . Poli (ADP-ribosa) polimerasa





## I. Introducción.





## 1. Muerte celular.

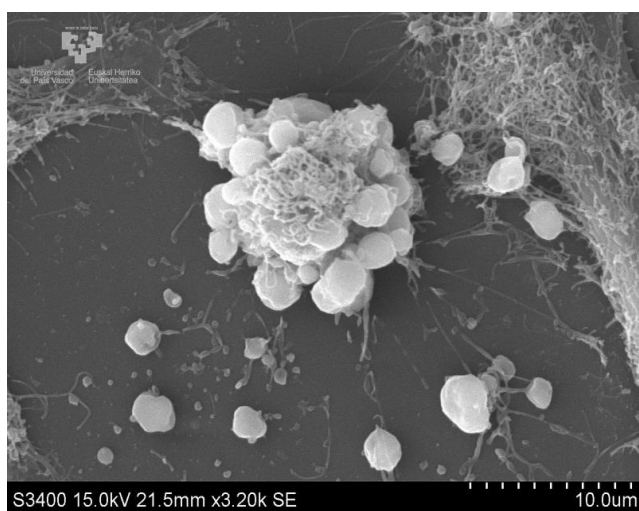
Aunque pueda parecer una cuestión baladí, no es trivial establecer el criterio para considerar una célula como célula muerta, ya que podríamos atender a criterios metabólicos, físicos o metodológicos para hacerlo. El comité de nomenclatura en muerte celular acordó en 2009 que una célula está muerta cuando ha perdido la integridad de la membrana plasmática, cuando el núcleo se ha fragmentado o cuando los cuerpos apoptóticos han sido fagocitados (Galluzzi *et al.*, 2009). Establece también considerar las células senescentes como vivas, aunque hayan perdido la capacidad clonogénica.

Hubo un tiempo en el que se pensaba que la única forma de muerte celular controlada era la apoptosis. Esa visión quedó atrás con la caracterización de diferentes formas de muerte controladas no apoptóticas. A día de hoy, hay descritos al menos tres tipos de muerte celular programada como son la muerte tipo I o apoptosis, la muerte tipo II o muerte celular por autofagia y la muerte tipo III o necrosis. Bien es cierto que constantemente se están describiendo nuevos procesos de muerte celular programada, que en un futuro podrán ser englobados dentro de las categorías anteriores como situaciones excepcionales, o como nuevas categorías de muerte celular. Algunos de los últimos nombres añadidos a esta lista de tipos de muerte celular controlada son la autosis, ferroptosis, partanatos y piroptosis, entre otros. Estos ejemplos están aún por caracterizar en detalle y por ser clasificados claramente entre los diferentes grupos.

### 1.1. Apoptosis.

En sus orígenes, la apoptosis fue definida por criterios morfológicos (Kerr *et al.*, 1972). Pero se ha ido viendo que estas características morfológicas no son universales, y que lo único que se mantiene constante en todas las condiciones es la actividad de las caspasas. Sí es cierto que se pueden distinguir una serie de características bioquímicas y fenotípicas que caracterizan la apoptosis. Se observa una retracción de los pseudópodos y redondeamiento general de la célula así como, en muchos casos, la liberación de la unión al sustrato. También es resaltable la morfología nuclear en la que destaca la reducción del tamaño del núcleo y la

condensación y fragmentación de la cromatina (aparición del característico núcleo picnótico que suele acompañar la apoptosis). Además, el contenido celular se ve drásticamente reducido en tamaño y es englobado y empaquetado en membranas intracelulares. Se forman por último, unas evaginaciones de la membrana celular que le confieren un aspecto característico llamado “*blebbing*” (Figura 1). Estas evaginaciones contienen porciones de citoplasma y son los llamados cuerpos apoptóticos, que serán liberados al medio extracelular y, bajo condiciones fisiológicas, serán fagocitados por células fagocíticas y por las células vecinas (Hanahan and Weinberg, 2011; Savill and Fadok, 2000).



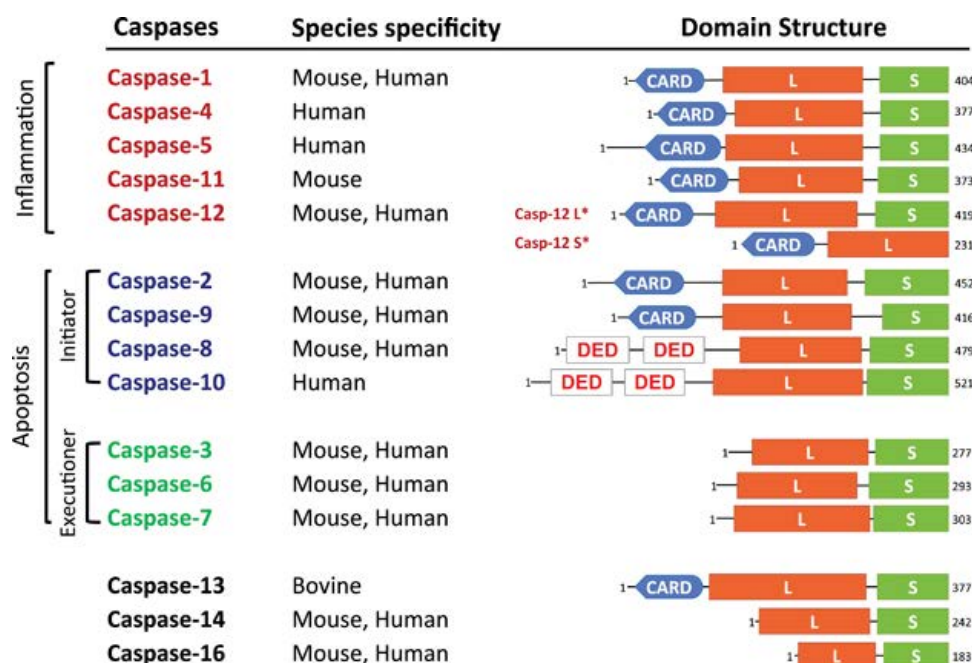
**Figura 1. Fotografía de una célula apoptótica.** Fotografía mediante microscopía de barrido de una célula apoptótica. Se aprecia claramente la formación de las evaginaciones de membrana y su liberación al medio extracelular. Fotografía perteneciente al V concurso fotografía científica de la Universidad del País Vasco (UPV).

### 1.1.1. Caspasas.

Las cisteinil-aspartil proteasas, comúnmente llamadas caspasas, son una de las moléculas más relevantes en la apoptosis, ya que son las encargadas de ejecutar toda la señalización previa y condenar a la célula a su muerte. Todo el fenotipo característico de la muerte apoptótica (condensación de la cromatina, el ya mencionado *blebbing*, la reducción del volumen celular y la pérdida de adhesión al sustrato) es debido a la acción de las caspasas. Las caspasas están también íntimamente relacionadas con otra funcionalidad: la inflamación.

Las caspasas involucradas en apoptosis (que son las que nos interesan especialmente en este trabajo), están clasificadas en caspasas iniciadoras y caspasas efectoras (Figura 2) atendiendo a la presencia o ausencia de dominios de interacción proteína-proteína en la región N terminal.

Estos dominios son fundamentales para las caspasas iniciadoras, ya que facilitan el reclutamiento en dímeros o grandes complejos de las caspasas para poder autoactivarse y desencadenar la cascada de señalización apoptótica (Park, 2012). Existen dos dominios de interacción entre proteínas en las caspasas iniciadoras: el dominio CARD que presentan las caspasas 2 y 9 y el dominio DED que se encuentra en las caspasas 8 y 10 (Figura 2).



**Figura 2. Clasificación de la familia de las caspasas en diferentes animales.** La imagen representa la clasificación de la estructura y la función de las caspasas placentarias de mamíferos. Las caspasas 1, 4, 5, 11 y 12 son inflamatorias. Las apoptóticas caspasas 2, 8, y 10 son iniciadoras, mientras que las caspasas 3, 6 y 7 son efectoras. Se muestran además los dominios estructurales CARD (del inglés *Caspase Recruitment Domain*) y DED (del inglés *Death Effector Domain*). L: subunidad grande, S: subunidad pequeña, S\*: forma corta, L\*: forma grande. Figura tomada de Shalini *et al.*, 2014 .

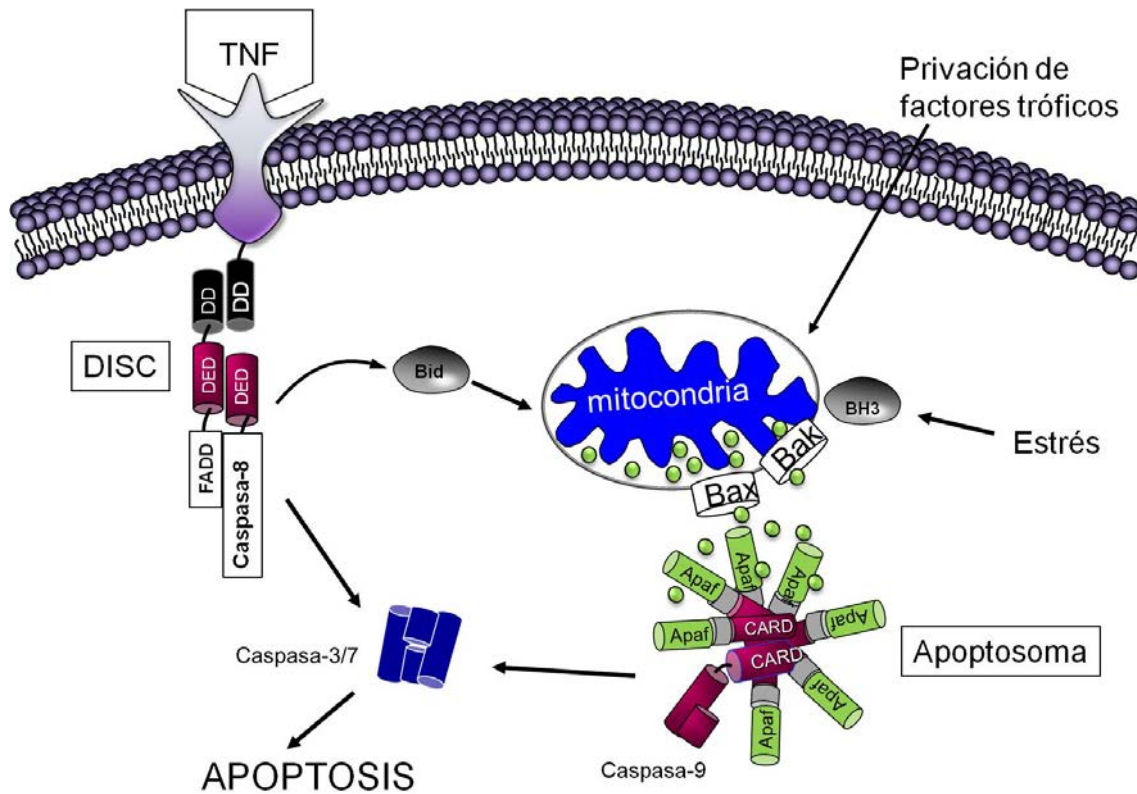
Las caspasas iniciadoras, dependiendo de la ruta en las que participan, tendrán un tipo de activación y unas características concretas diferentes entre sí. Por ejemplo, la caspasa 9 no es activada a través de la unión a proteínas de anclaje a los receptores de muerte, sino que forma parte del apoptosoma. Por otro lado, la caspasa 8 puede participar en otro tipo de muerte celular a parte de la apoptosis: la necroptosis. Se ha descrito que esta caspasa forma parte del denominado necrosoma. Por último, también es de resaltar que la caspasa efectora caspasa 3, mediante el corte de Beclina-1, puede bloquear la autofagia (Shalini *et al.*, 2014).

### 1.1.2. Rutas de activación.

La apoptosis es un proceso biológico fuertemente conservado a lo largo de la evolución (Munoz-Pinedo, 2012), y en el que en su regulación intervienen gran cantidad de proteínas, en su mayoría, relacionadas con la regulación del proceso a nivel de la mitocondria. Muchas de estas proteínas pertenecen a la familia de proteínas Bcl-2 (Droin and Green, 2004; Lanave *et al.*, 2004).

Hay dos vías principales de ejecución de la apoptosis que se distinguen básicamente por la necesidad o no de las proteínas de la familia Bcl-2 y de las caspasas que intervienen. No obstante, ambas vías convergen en la activación de estas proteasas, cuya activación provoca la degradación de sustratos que son esenciales para la viabilidad celular (Logue and Martin, 2008).

La vía extrínseca o vía receptor de muerte suele ser activada por la unión de receptores de muerte a sus agonistas. Los receptores de muerte, como el receptor del Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), tienen un dominio intracelular (normalmente llamado dominio de muerte y abreviado “DD” del inglés *Death Domain*). Estos dominios específicos son esenciales para el reclutamiento y activación, a través de proteínas adaptadoras como FADD (del inglés *FAS-Associated Death Domain protein*) y/o TRADD (del inglés *TNFR-Associated Death Domain protein*), de una caspasa iniciadora (Hsu *et al.*, 1995). Al complejo formado por las proteínas adaptadoras unidas a la parte intracelular del receptor junto con la caspasa iniciadora se le denomina DISC (del inglés *Death Inducing Signaling Complex*). Existen multitud de receptores de muerte, pero los más estudiados son el ya mencionado receptor de muerte TNFR1, Fas y los receptores de TRAIL (TRAIL-R1 y TRAIL-R2). La caspasa iniciadora 8 (por ejemplo) tras ser activada, puede cortar a Bid (ahora tBid) quién puede enlazar con la vía mitocondrial y amplificar la señal, hasta que se activa la caspasa efectora caspasa 3 (por ejemplo) y se comienzan a degradar sustratos esenciales para la célula (Figura 3).



**Figura 3. Vías de apoptosis extrínseca y mitocondrial.** En la extrínseca, los ligandos de muerte TNF, TRAIL o Fas Ligando activan a los receptores de muerte en la membrana. En la parte citoplasmática, la proteína adaptadora FADD interacciona con el receptor a través de los dominios DD. A su vez, FADD recluta a la caspasa 8 a través del dominio DED. La caspasa 8 entonces puede activar directamente a las caspasas efectoras, caspasa 3 y caspasa 7, o inducir el corte de Bid, que activa a Bax y Bak en la mitocondria. En la vía mitocondrial, las proteínas “BH3-only”, como Noxa, Puma o Bim, activan a Bax y Bak induciendo la permeabilización de la membrana mitocondrial y la liberación de citocromo c (esferas en verde). El citocromo c provoca la oligomerización de Apaf-1 y de la caspasa 9 formando el apoptosoma. Una vez activada, la caspasa 9, es capaz de cortar y activar a su vez a las caspasas efectoras. Figura modificada de Munoz-Pinedo, 2012.

Por otro lado, la ruta mitocondrial es activada por estímulos citotóxicos como el daño del material genético, la falta de nutrientes, el estrés reticular y otras señales de estrés que finalmente activan la caspasa iniciadora caspasa 9 (Hakem *et al.*, 1998). Esta ruta está fuertemente controlada por las proteínas de la familia Bcl-2, y el balance que hay entre las proteínas proapoptóticas y antiapoptóticas de esta familia. Para la ejecución de la apoptosis, las proteínas Bax y Bak han de ser activadas y deben oligomerizar en la superficie de la MME (Membrana Mitocondrial Externa) formando poros en la mitocondria. La formación de estos poros provoca la liberación del contenido del espacio intermembrana al citoplasma. Se libera pues, citocromo c del interior mitocondrial que será pieza fundamental en la unión con Apaf-1 (del inglés *Apoptotic protease-activating factor*) y la caspasa 9, formando lo

que se conoce como el apoptosoma, que será el encargado de cortar y activar la caspasa efectora (Figura 3).

Hoy en día se sigue manteniendo la nomenclatura de las dos vías de activación por comodidad aunque se conoce que existen puntos en las vías de señalización en las que ambas pueden converger.

### 1.2. Necrosis.

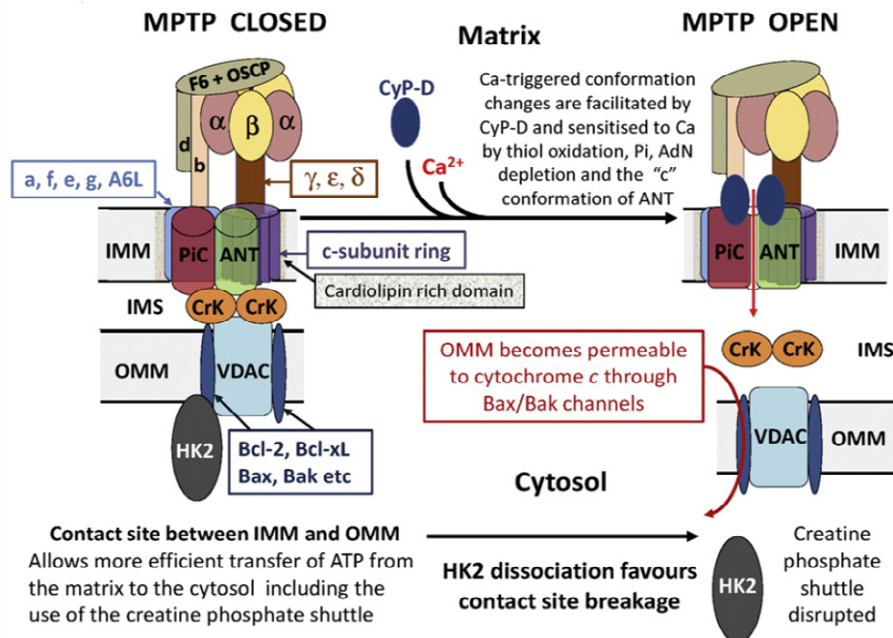
La necrosis ha sido históricamente considerada como un tipo de muerte celular accidental y consecuencia de una situación física extrema (temperatura, presión...). No obstante, en los últimos años se ha podido comprobar que existen muchas situaciones fisiológicas y patológicas en las que la necrosis puede ser desencadenada y ser llevada a cabo de forma ordenada. La necrosis se caracteriza por ser un tipo de muerte celular que produce inflamación en el tejido circundante porque la célula pierde su integridad de membrana y libera el contenido citoplasmático al medio extracelular.

Parece que la necrosis podría ser la vía de muerte celular controlada por defecto debido a que la inhibición de pasos fundamentales en la apoptosis puede conducir a la muerte por necrosis tanto *in vitro* como *in vivo* (Chautan *et al.*, 1999), siendo especialmente remarcable que el cambio de apoptosis a necrosis puede seguir siendo fisiológicamente viable. Así, la necrosis simplemente sustituye una apoptosis fallida. Esto refuerza mucho el concepto de que la necrosis es la “última puerta de salida” de la célula. En ciertos modelos, la inhibición de ciertas etapas de la apoptosis puede acarrear la muerte por autofagia, pero si se bloquea además la muerte por autofagia, la célula puede acabar muriendo por necrosis (Degenhardt *et al.*, 2006; Shimizu *et al.*, 2004).

Parece además que la inhibición de caspasas hace que la célula sea más sensible a la muerte por necrosis inducida por TNF- $\alpha$  (Vercammen *et al.*, 1998), lo que implica que la apoptosis está inhibiendo de alguna manera la muerte por necrosis. Esto último sugiere un “orden prioritario” en los mecanismos de muerte.

### 1.2.1. Muerte por apertura del poro de permeabilidad transitoria mitocondrial (PPTM).

La permeabilidad transitoria mitocondrial es un fenómeno definido como un colapso del gradiente quimiosmótico a través de la MMI (Membrana Mitocondrial Interna) debido a la apertura de un poro de larga conductancia que se conoce como PPTM. No debe confundirse con el poro formado por las proteínas de la familia Bcl-2 en la MME y que tiene como resultado la activación de la apoptosis, ya que la inducción de la apertura del PPTM induce necrosis (Baines *et al.*, 2005; Bernardi and Petronilli, 1996; Lemasters, 1999; Nakagawa *et al.*, 2005). La composición del poro propiamente dicha está aún bajo polémica. Hay autores que mantienen que el poro lo forman principalmente las proteínas VDAC (desde el citosol hasta el espacio intermembrana mitocondrial) y ANT (desde el espacio intermembrana hasta la matriz mitocondrial, Zamzami and Kroemer, 2001), y otros completan la imagen del complejo con la ATPasa (Halestrap, 2014). La apertura del PPTM provoca la disrupción del potencial de membrana mitocondrial, lo que conlleva una serie de repercusiones fundamentales para el destino fatal de la célula.



**Figura 4. Representación esquemática de la apertura del PPTM.** La figura representa de forma simplificada uno de los modelos actuales que tratan de explicar la composición de la maquinaria del poro de permeabilidad transitoria mitocondrial. En ella podemos observar el papel de la ciclofilina D (en la imagen rotulada como CyP-D), la proteína ANT, el canal de fosfato (PiC) y la ATP sintasa regulando la actividad del poro. El aumento de calcio y la presencia de la ciclofilina D inducen la apertura de un canal a través de la MMI y gracias a un cambio conformacional de la proteína ANT. Figura tomada de Halestrap and Richardson, 2015.



La primera es la desaparición de la barrera entre la mitocondria y el citosol, con la consecuente liberación de cofactores e iones (entre los que se encuentran el calcio y el citocromo c) que en el citosol pueden desencadenar la muerte celular. Además, la mitocondria no puede sintetizar ATP debido a que la ATPasa necesita una diferencia de potencial para poder sintetizar ATP, con lo que se produce un fallo energético masivo. Ambas consecuencias provocan cascadas de señalización que activarán finalmente a p53. La proteína p53 es responsable de la apertura de estos canales mediante la unión con la proteína ciclofilina-D (Vaseva *et al.*, 2012) que es uno de los mayores moduladores de la transición de la permeabilidad mitocondrial. Se ha comprobado que ambas moléculas son esenciales en la apertura del poro en isquemia cerebral (Vaseva *et al.*, 2012).

Aunque aún están por esclarecer las causas moleculares concretas que provocan la muerte, hoy ya sabemos que la apertura del poro provoca fallo masivo en las funciones mitocondriales, daño irreversible del orgánulo y probablemente esto sea lo que lleva a la muerte a la célula. La apertura del PPTM está aún siendo caracterizada, pero se ha involucrado a este fenómeno necrótico con muchas patologías y síndromes, entre ellos la neurodegeneración por isquemia/reperfusión (I/R).

### 1.2.2. Necroptosis.

La necroptosis se ha convertido en los últimos 5 años en el tema estrella de los congresos de muerte celular. Desde que se documentó este fenómeno en 1998 (Vercammen *et al.*, 1998), se ha avanzado mucho en el conocimiento molecular de la señalización de este peculiar tipo de necrosis. Necroptosis podría definirse rápidamente como: tipo de muerte celular controlada, necrótica, que depende fundamentalmente de RIPK3 (del inglés *Receptor-Interacting Protein Kinase*) y de receptores de muerte para formar el necrosoma, que es la plataforma que ejecutará el proceso.

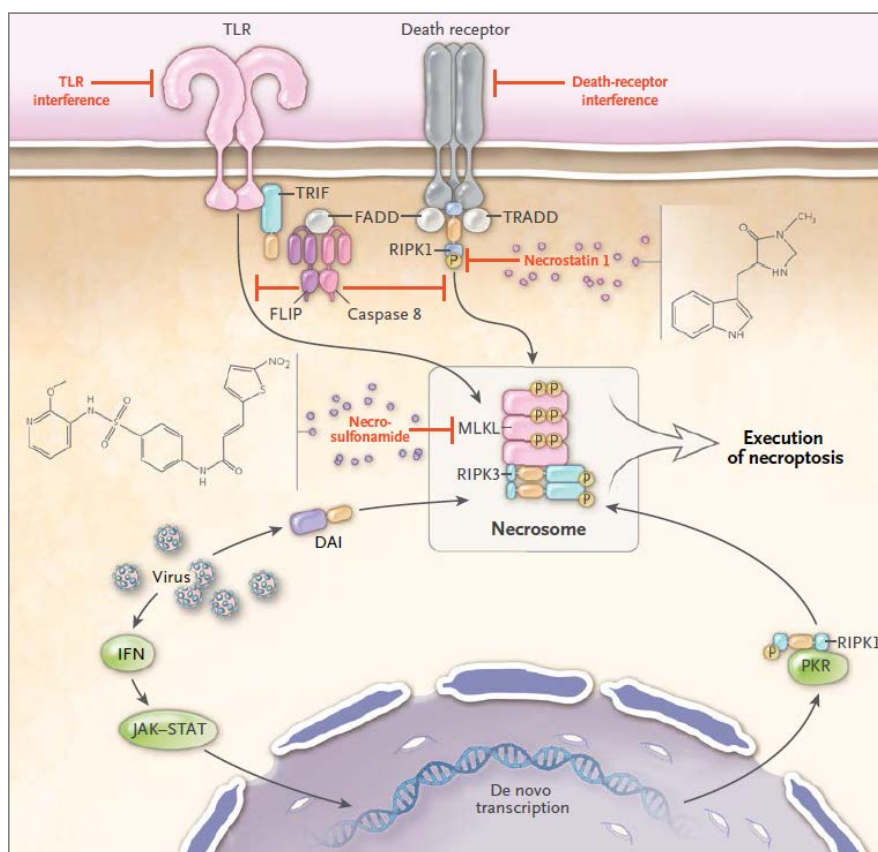
La mayor parte de los estudios de la necroptosis se han realizado activando un receptor de muerte y bloqueando la apoptosis mediante inhibidores de caspasas (Zhang and Zhong, 2014). Hoy sabemos que, efectivamente, para que la necroptosis tenga lugar, la funcionalidad de la caspasa 8 ha de estar comprometida, modificada o

completamente inhibida. Esto es interesante porque podría explicarse como respuesta a virus o bacterias que inducen la síntesis de moléculas inhibidoras de la apoptosis y al bloquearse este tipo de muerte celular, la estabilidad del organismo puede verse comprometida. La existencia de este tipo de muerte podría implicar un nuevo en el mecanismo de defensa frente a patógenos. Además, la necroptosis provoca la liberación del contenido celular, lo que produce inflamación y la subsecuente liberación de citoquinas como el IFN (interferón) que es capaz de inducir apoptosis y necrosis.

Existen diversos estímulos que pueden desatar esta respuesta y por tanto, hay diferentes moléculas sensoras. En humanos existen (identificadas hasta ahora) 4 moléculas con el dominio RHIM que son RIPK1, RIPK3, TRIF y DAI.

Cuando la actividad de la caspasa 8 está inhibida, ya sea por inhibidores químicos o proteínas tipo CrmA (proteína viral que inhibe la apoptosis), FADD unida a la caspasa 8 puede reclutar a RIPK1, que sufre una serie de modificaciones (ubiquitinaciones, fosforilaciones y desubiquitinaciones) que tendrán como consecuencia la exposición del dominio RHIM, con el que captará a RIPK3. La unión de RIPK1 y RIPK3 puede provocar la autofosforilación cruzada y la unión de más moléculas de RIPK3 (Li *et al.*, 2012). Al complejo FADD-Caspasa 8-RIPK1-RIPK3 se unirá MLKL para formar el necrosoma (Figura 5). Otra molécula con este dominio es TRIF, la encargada de transmitir la señal a través de los receptores TLR (del inglés *Toll Like Receptor*). Estos receptores son capaces de detectar diferentes tipos de estímulos (infecciones microbianas, por ejemplo).

Por último, DAI es responsable de transmitir la señal de infección por virus de ARN mediante la inducción de la formación del necrosoma. La infección por virus, en fin último, conlleva la síntesis de IFN, que a través de la vía JAK-STAT producirá la síntesis *de novo* de PKR, quien fosforila a FADD para que reclute a RIPK1, induciéndose así la formación del necrosoma (Linkermann and Green, 2014). Una vez formado el necrosoma, MLKL oligomeriza (no se sabe aún si trimeriza o tetrameriza) y se desplaza a la membrana plasmática donde (aún de forma desconocida) provoca la muerte de la célula (Cai *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2014). También se ha propuesto que la mitocondria puede inducir la muerte celular (una



**Figura 5. Activadores del necrosoma como dianas terapéuticas.** En situaciones en las que la caspasa 8 no puede inducir apoptosis, se forma el necrosoma a partir del reclutamiento de la caspasa 8 por parte de FADD. Se unen después RIPK1, RIPK3 y MLKL que tras oligomerizar inducirá la muerte celular por necroptosis. Se pueden apreciar también las diferentes dianas conocidas para bloquear este proceso. Figura de Linkermann and Green, 2014.

vez oligomerizada la proteína MLKL) debido a que el necrosoma se asocia a la membrana mitocondrial y provoca el aumento descontrolado de ROS (Chen *et al.*, 2013). No obstante, aún no están claras las bases moleculares de la ejecución de la necroptosis.

Lo más curioso de la necroptosis es que está inhibida fuertemente por el complejo FADD-caspasa 8-FLIP<sub>L</sub> (FLIP<sub>L</sub> es también represor de la apoptosis) (Vanden Berghe *et al.*, 2014). La delección sistémica de uno de estos componentes en ratones causa muerte del embrión. Este fenómeno se revierte si además de eliminar un componente se elimina también RIPK3 (Oberst *et al.*, 2011; Roca and Ramakrishnan, 2013).

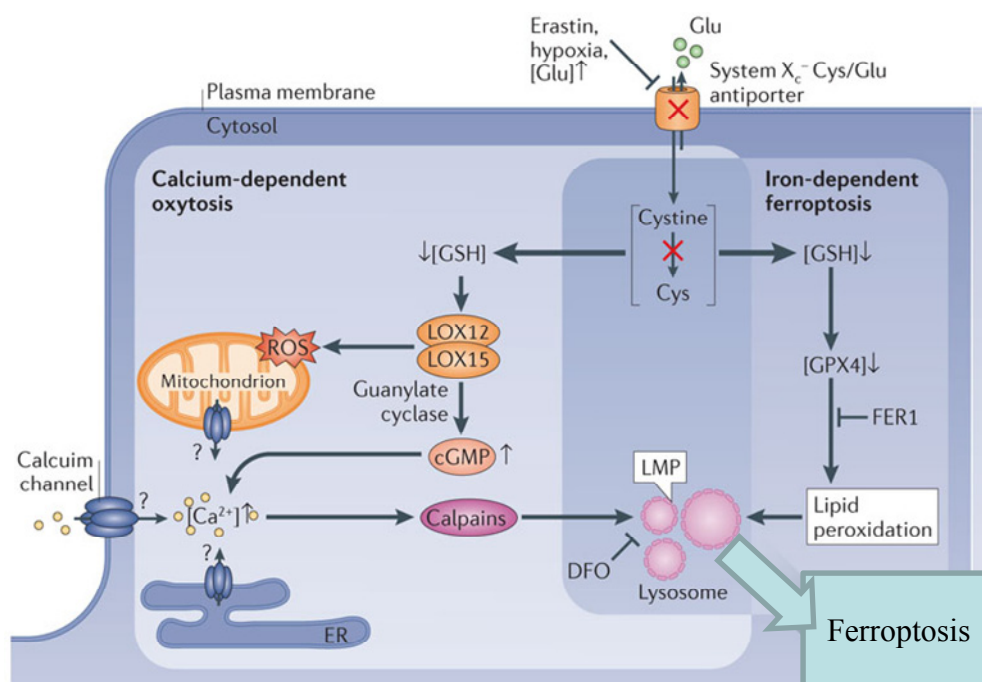
Cada vía de señalización puede ser propuesta como diana de nuevas terapias clínicas (Figura 5), ya que la necroptosis se ha visto vinculada a numerosas afecciones entre las cuales encontramos isquemia-reperfusión en corazón (Oerlemans *et al.*, 2012),

riñón (Linkermann *et al.*, 2012) y cerebro (Degterev *et al.*, 2005), pancreatitis (He *et al.*, 2009) o aterosclerosis (Lin *et al.*, 2013).

### 1.2.3. Ferroptosis.

La ferroptosis es un tipo de muerte necrótica dependiente de hierro que es provocada por la acumulación de ROS y de lípidos peroxidados. Este tipo de necrosis está aún por caracterizar en detalle, pero ciertos aspectos relevantes de ella ya han sido demostrados. La ferroptosis fue descrita al descubrir que células transformadas con el oncogén RAS morían de forma selectiva, cuando eran tratadas con la molécula erastina. Esta molécula afecta al sistema de transporte de cisteína y glutámico a través de la membrana plasmática conocido como sistema  $X_C^-$  Cys/Glu (Yagoda *et al.*, 2007). Este sistema se encarga de introducir cisteína desde el medio extracelular al interior celular, a la vez que libera glutámico en sentido opuesto. En el momento en el que este sistema de antiporte es bloqueado, la cistina no es separada en cisteína, lo que provoca una bajada en los niveles de glutatión (Figura 6). El glutatión es una molécula fundamental en el mantenimiento del estado REDOX celular mediante las enzimas glutatión peroxidasas. Estas enzimas oxidan el glutatión para reducir el peróxido de hidrógeno en agua, pero si los niveles de glutatión reducido no son suficientes, estas enzimas no tienen sustrato para catalizar la reacción y el  $H_2O_2$  se acumula y acaba por inducir la muerte celular por exceso de lípidos peroxidados (Figura 6). La ferroptosis ha sido inhibida mediante el bloqueo de la entrada de hierro, el uso de quelantes del mismo (Kurz *et al.*, 2006) y de ferrostatina-1 (Dixon *et al.*, 2012). Aunque se ha demostrado que los quelantes de hierro protegen la célula de la ferroptosis, hoy aún no se sabe el papel que juega el hierro en este tipo de muerte celular.

La ferroptosis ha sido relacionada con I/R en riñón (Linkermann *et al.*, 2014) aunque aún no en sistema nervioso. El bloqueo del sistema de antiporte  $X_C^-$  Cys/Glu debido al exceso de glutamato en el sistema nervioso, participa en lo que se conoce como excitotoxicidad neuronal. No obstante, y aunque el comienzo de la vía sea similar, la excitotoxicidad (que será descrita en el apartado 4.2.3), depende fundamentalmente de los niveles de calcio, mientras que la ferroptosis depende de los de hierro.



**Figura 6. Representación esquemática de la muerte por ferroptosis.** El tratamiento con Erastina induce la inhibición del sistema de antiporte de cisteína y glutámico. Esto provoca el descenso en los niveles de glutatión reducido, que es fundamental para que la enzima glutatión peroxidasa pueda mantener los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bajo el umbral nocivo. La acumulación de ROS induce la peroxidación de lípidos que acabará por inducir la muerte de la célula. Imagen extraída y modificada de Vanden Berghe *et al.*, 2014.

### 1.3. Muerte autofágica.

A diferencia de la apoptosis y de la necrosis que son fenómenos rápidos, la muerte autofágica es un proceso de degeneración y ulterior muerte celular lento, en el cual partes de citoplasma son secuestradas por vesículas de doble membrana, que serán digeridas dentro de la propia célula a través de la acción de hidrolasas ácidas. La autofagia fue considerada en un principio como un fenómeno de respuesta frente a la falta de nutrientes, y por el cual se “reciclan” partes de la célula (desde porciones de citoplasma hasta orgánulos enteros) con el fin de utilizar las moléculas esenciales obtenidas para mantener el balance energético de la célula. También ha sido clásicamente catalogado como un proceso cuya finalidad es la de eliminar orgánulos dañados y mantener así el correcto funcionamiento de la célula. Dicho de otra manera, la autofagia ha sido denominada como un proceso de “supervivencia”.

Hoy en día (no sin polémica) se considera la muerte autofágica o muerte por autofagia es un tipo de muerte celular en el que la muerte de la célula se produce a través del proceso autofágico en sí mismo. La degradación exacerbada de diferentes

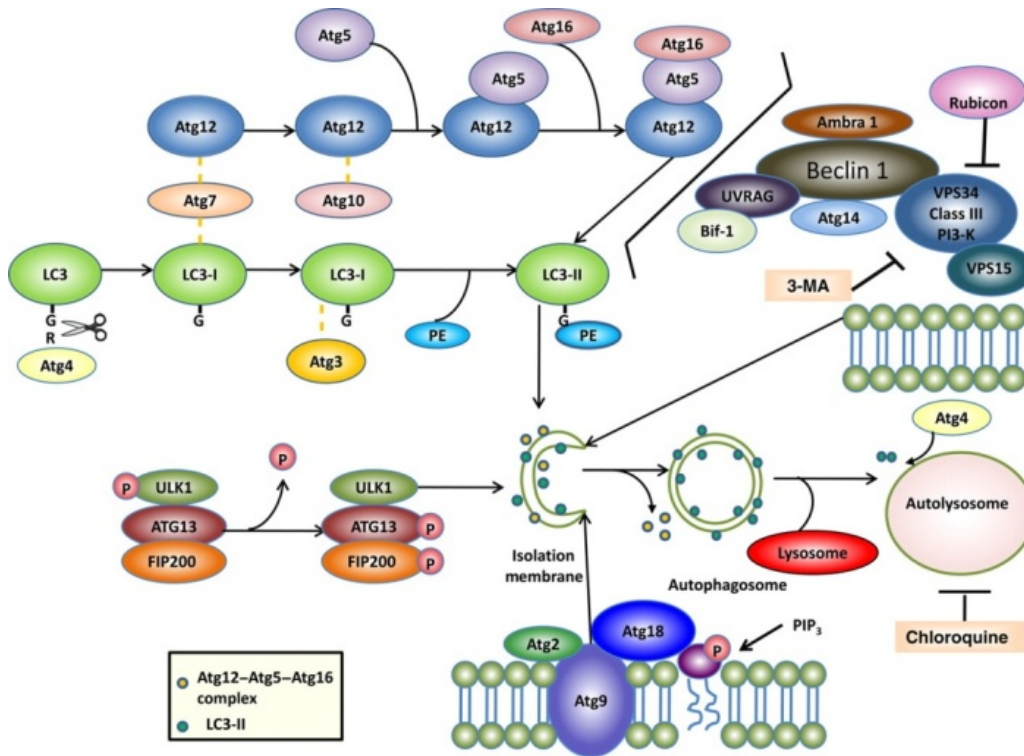
fragmentos celulares acaba provocando la inviabilidad de la propia célula. De esta manera, si se bloquea la autofagia (silenciando alguno de los genes esenciales en el proceso o con inhibidores del flujo) se ha de recuperar la viabilidad y evadir la muerte celular.

En muchas ocasiones, otros tipos de muerte celular programada pueden ir asociados con un alto grado de autofagia, pero eso no puede considerarse muerte autofágica, ya que si se bloquea la autofagia en estas situaciones, la muerte acabará llevándose a cabo igualmente (aunque cambie la apariencia celular).

### **1.3.1. Proceso autofágico.**

Existen diferentes tipos de autofagia atendiendo al mecanismo y la función: microautofagia (Marzella *et al.*, 1981), mediada por chaperonas (Arias and Cuervo, 2010) o macroautofagia que es el tipo más estudiado en este ámbito. El proceso de macroautofagia (comúnmente simplificado en autofagia) ocurre espontáneamente a nivel basal en multitud de órganos y tejidos (Mizushima *et al.*, 2004) y es esencial para la supervivencia en la lactancia de mamíferos (Kuma *et al.*, 2004).

El flujo autofágico comienza a partir de la unión de Beclina-1 y vps34 a la que le seguirá una unión sucesiva de moléculas esenciales en la formación del autofagosoma, como son las proteínas Atg (3, 5, 7, 10...). Para que todas estas moléculas puedan unirse a la doble membrana que servirá de punto de inicio para la elongación del autofagosoma, PI3K ha de activarse para formar dos complejos cruciales: ATG5/12 y LC3-fosfatidiletanolamina (LC3-II). La unión de las proteínas reguladoras de la autofagia ya mencionadas (Atgs) junto con el complejo LC3-II, induce y regula la elongación de la membrana inicial hasta la formación final del autofagosoma (Singh and Cuervo, 2011). El autofagosoma seguirá creciendo hasta que se fusione con un lisosoma formándose el autofagolisosoma (Figura 7). En ese momento, las hidrolasas ácidas que hay en el lisosoma digerirán todo el contenido hasta moléculas más pequeñas que pueden ser utilizadas por la célula para la síntesis de proteínas, ácidos nucleicos y demás macromoléculas. Todo el transcurso desde que se inicia la autofagia hasta la unión del autofagosoma con el lisosoma, es lo que se conoce como flujo autofágico.



**Figura 7. Esquema del flujo autofágico.** En el diagrama se observan todas las proteínas que intervienen en las primeras etapas de la autofagia. También se muestran los puntos concretos del proceso en donde actúan dos de las drogas más utilizadas para bloquear la autofagia: 3metiladenina y cloroquina. Figura extraída de Ding *et al.*, 2012.

El contenido del autophagosome suele estar determinado por el marcaje con la molécula SQSTM1 o más comúnmente denominada p62. Esta molécula quedará englobada dentro del autophagosome y será destruida junto con el resto de material del interior. También suele utilizarse LC3-II como indicador del flujo autofágico. (Figura 8)

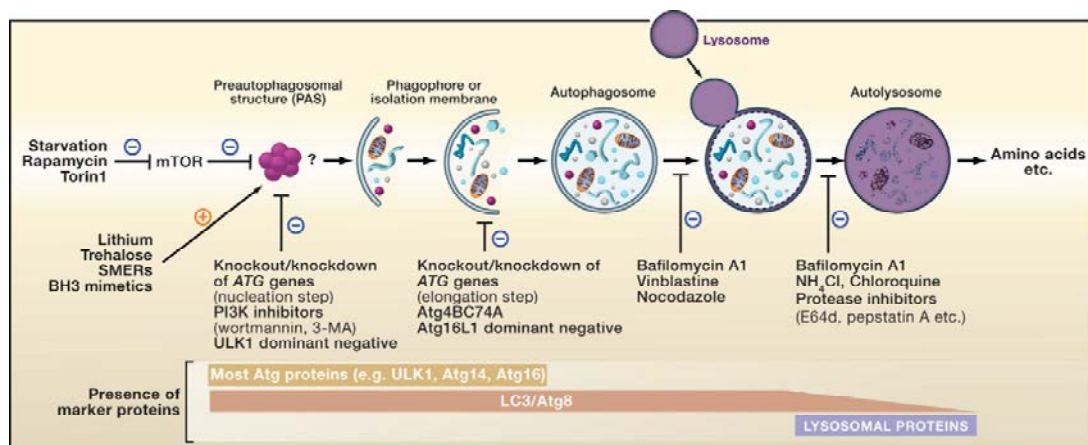
### 1.3.2. Regulación de la autofagia.

Las principales moléculas reguladoras del proceso autofágico son las proteínas Atg (del inglés *Autophagy-related genes*). Las proteínas Atg organizan complejos que median los diferentes estadios del proceso.

Las primeras etapas están reguladas por la presencia de Bcl-2, que inhibe la autofagia al unirse a Beclina-1, impidiendo que ésta se una a vps34. Esta interacción entre Beclina-1 y Bcl-2 está inhibida por privación de nutrientes y señales de supervivencia a través de JNK1 así como miméticos de las proteínas BH3-only



(Figura 8). Estos estímulos son fuertes inductores de la autofagia. Dentro de la privación de nutrientes, el caso más controvertido es el de la glucosa. Al principio se consideró que la autofagia era una respuesta a la falta de nutrientes y, sobre todo de glucosa. Esto ha sido mantenido hasta hace poco tiempo cuando surgió la polémica con varios estudios que describían cómo la falta de glucosa bloquea el flujo autofágico otorgándole el papel contrario al hasta entonces aceptado (Moruno-Manchon *et al.*, 2013; Ramirez-Peinado *et al.*, 2013; Xi *et al.*, 2013).



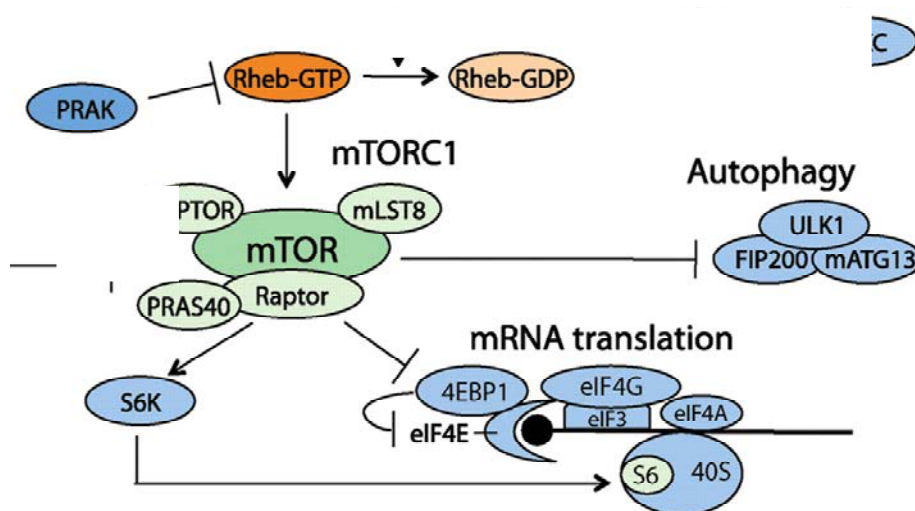
**Figura 8. Principales reguladores e inhibidores del proceso autofágico.** Entre los principales reguladores del flujo autofágico vemos representado al complejo mTOR que aparece inhibido en situación de falta de nutrientes. Aparecen además señaladas las dianas de varias drogas que inhiben o bloquean el flujo. Por último, en la parte inferior de la figura encontramos algunos de los marcadores utilizados para el estudio de la autofagia y las etapas en las que son válidos. Figura extraída de Mizushima *et al.*, 2010.

En los últimos años se ha descrito mucho el papel del complejo mTOR (del inglés *mammalian Target Of Rapamycin*) como principal regulador negativo de este proceso. El complejo mTOR es uno de los “centros neurálgicos” de regulación dentro de la célula. Hasta él llegan estímulos sobre el estado energético celular (en función de la proporción ATP/ADP), el estado metabólico, la cantidad de nutrientes disponibles (y el tipo), la cantidad de oxígeno... Cuando todos estos estímulos son apropiados para la célula, mTOR está activo y el estado metabólico celular es anabólico y la síntesis de proteínas y de ácidos nucleicos está inducida. Cuando mTOR está activo, fosforila a ULK que se une a uno de los complejos de inicio de la autofagia, bloqueando que pueda seguir el proceso (Figura 9). Además, fosforila a la quinasa de S6 (S6K) quien a su vez, fosforila a la proteína S6 permitiendo la síntesis de proteínas (Figura 9). Este complejo en estado activo también fosforila a 4E-BP1 (del inglés *Eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1*). 4E-BP1 es



un represor de la síntesis proteica que al unirse a eIF4E, evita que esta se produzca. Al ser fosforilado por mTOR, este no se puede unir a eIF4E y la traducción del mensajero puede comenzar.

En el momento en el que el estado energético o la cantidad de nutrientes (aminoácidos, por ejemplo) no es suficiente, Raptor se une a mTOR y lo bloquea, de forma que ni la quinasa de S6 ni la propia S6 estarán fosforiladas ni activas, y la síntesis de proteínas se detendrá. Además, la autofagia podrá desarrollarse sin problemas debido a que ULK no se encuentra fosforilado (Figura 9).



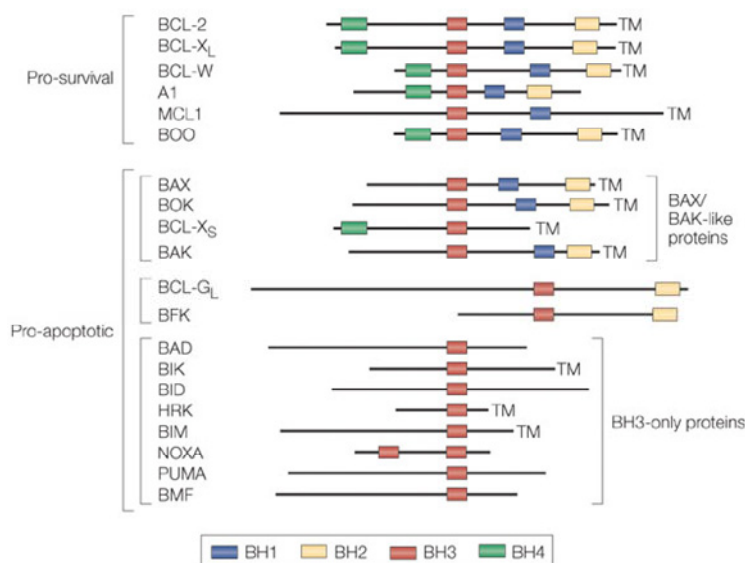
**Figura 9. Regulación de la autofagia y la síntesis de proteínas por mTOR.** El complejo mTOR es capaz de bloquear la autofagia al fosforilar a ULK1 e inducir la síntesis de proteínas fosforilando tanto a 4E-BP1 como a S6K. ULK1 se unirá al complejo iniciador de la autofagia y bloqueará que el proceso pueda comenzar. Por su parte, S6K fosforila a la proteína ribosomal S6, permitiendo que tenga lugar el comienzo de la traducción del mensajero. La fosforilación de 4E-BP1 inhibe a esta proteína, cuya función es evitar que eIF4E pueda unirse a la cabeza del mensajero y permitir el comienzo de la traducción. Figura adaptada de Suzuki and Inoki, 2011.

## 2. Proteínas de la familia Bcl-2.

Las proteínas de la familia Bcl-2 son un gran grupo de proteínas que tienen como función principal la regulación de la permeabilidad de la membrana mitocondrial y el control de la apoptosis (muchas de ellas tienen otras funciones que resultan fundamentales en diversos aspectos como metabolismo, estrés reticular, autofagia...).

## 2.1. Clasificación.

Dentro de la familia Bcl-2 podemos hacer distinción de tres grupos diferentes atendiendo a su estructura y función. Las proteínas de esta familia tienen una estructura heterogénea en la que se repiten ciertos dominios que se llaman dominios BH (del inglés *Bcl-2 Homology*). Hay cuatro dominios BH descritos hasta el momento y atendiendo al número y tipo de dominios que presentan, podemos clasificar a los miembros de la familia Bcl-2 en proteínas multidominio antiapoptóticas (contienen dominios BH1-4), multidominio proapoptóticas (contienen los dominios BH1-3) y las proteínas BH3-only (que contienen sólo el dominio BH3). Las proteínas BH3-only comprenden un número creciente de proteínas que tienen en común un motivo de entre 15 a 21 aminoácidos (Lomonosova and Chinnadurai, 2008; Youle and Strasser, 2008).



**Figura 10. Clasificación de las proteínas de la familia Bcl-2 atendiendo a su función.** La figura muestra las tres categorías en las que se clasifican los miembros de la familia Bcl-2 atendiendo a la función que desempeñan en la regulación apoptótica. La estructura de las proteínas de la familia Bcl-2 está determinada por el tipo de dominio BH que contiene. BH1 en azul, BH2 en amarillo, BH3 en rojo y BH4 en verde. Figura extraída de Strasser, 2005.

El dominio BH3 es esencial para la función de las proteínas de toda la familia Bcl-2. Esta región permite la interacción entre los miembros de la familia. La homología en esta región es relativamente laxa y sólo unos cuantos residuos están realmente conservados dentro de la familia. Por este motivo, estas proteínas han sido identificadas más por su función que por homología en la secuencia de aminoácidos.

### 2.2. Relación con apoptosis.

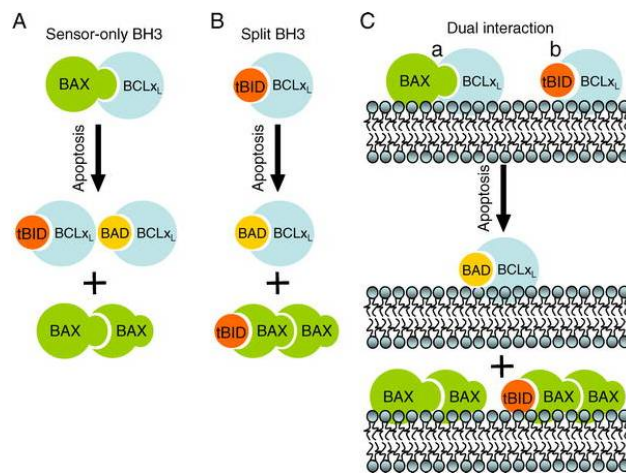
Los miembros de la familia Bcl-2 son reguladores de la vía mitocondrial y han sido bien caracterizados durante la última década (Hetz and Glimcher, 2008).

Dentro del primer grupo, el de las proteínas multidominio proapoptóticas, se encuentran las proteínas Bak y Bax que son las principales inductoras de la apoptosis. Bak o Bax pueden oligomerizar causando la apertura de poros en la MME que darán lugar, en última instancia, a la muerte celular (Korsmeyer *et al.*, 2000). En los últimos años se ha incluido a Bok como tercer miembro de este escueto grupo de proteínas.

En el segundo grupo se encuentran las proteínas multidominio, antiapoptóticas. Los miembros más representativos de este segundo grupo son Bcl-2, Bcl-xL y Mcl-1. Su principal función es evitar la activación y oligomerización de los miembros del primer grupo, evitando así la activación de la apoptosis. Estas proteínas se unen a los miembros proapoptóticos de la familia evitando que oligomericen (en el caso de las multidominio BH1-3) o que puedan desatar la cascada apoptótica (en el caso de las proteínas BH-only).

Por último, las proteínas BH3-only, también proapoptóticas (Shamas-Din *et al.*, 2011), tienen en común la presencia de este único dominio que consiste en 15-21 aminoácidos. El núcleo de este dominio está formado solamente por una secuencia de 8 residuos que no está muy conservada evolutivamente. Esta secuencia está formada por LXXXGDE (L es leucina, G es glicina, D es aspártico, E es glutámico y X significa cualquier aminoácido) donde la leucina y el aspártico conservados en el dominio son esenciales para formar la interacción con el resto de los miembros de la familia y así desarrollar su función. La función de las BH3-only es unirse y secuestrar las proteínas de la familia que pertenecen al segundo grupo, las antiapoptóticas. Al hacerlo, evitan que estas puedan llevar a cabo su función y las proteínas del primer grupo (Bak y Bax) pueden oligomerizar y causar el inicio de la apoptosis. Además, las proteínas BH3-only pueden unirse directamente y activar a las proapoptóticas BH1-3. La existencia de diferentes secuencias de los dominios BH3 provoca que existan diferentes afinidades entre proteínas BH3-only y el resto

de miembros de la familia (Lomonosova and Chinnadurai, 2008). Las proteínas BH3-only actúan como sensores de señales que provienen de varios procesos celulares tales como estrés reticular, señales de crecimiento fisiológico, estrés oncogénico y respuesta frente a la radio y quimioterapia. Las BH3-only descritas hasta ahora son: Bim, Bid, Bad, Hrk, Puma, Noxa, Bmf, Bnip3, Bnip3L, Bcl-gS y Beclina-1. Beclina-1 y Bnip3 son un tanto atípicas, ya que han sido descritas más como proteínas relacionadas con la inducción de autofagia que como involucradas en apoptosis (Sinha and Levine, 2008).



**Figura 11. Representación esquemática de los diferentes modelos de las relaciones funcionales entre las proteínas de la familia Bcl-2.** En la imagen aparecen Bcl-xL (antiapoptótica), la proapoptótica Bax, y la BH3-only Bid (truncada en el extremo N-terminal o tBid), y Bad (una BH3-only del tipo sensor). Se pueden apreciar los tres modelos de interacción entre las proteínas proapoptóticas y antiapoptóticas de la familia Bcl-2 para la activación apoptótica.

Figura de Basáñez and Hardwick, 2008.

El modo de acción de las BH3-only aún no se conoce a ciencia cierta, pero existen tres modelos ampliamente aceptados, aunque algo controvertidos. Según el primer modelo, las proteínas BH3-only son capaces de inactivar las proteínas Bcl-2 antiapoptóticas mediante la interacción directa con estas, permitiendo así la oligomerización y activación de Bax y Bak que formarán un poro en la MME (Figura 11). La formación del poro supone la liberación del material del espacio intermembrana que, entre otras sustancias, contiene citocromo c. Al ser liberado al citosol, el citocromo c, puede unirse a la proteína adaptadora Apaf-1, propiciando la formación del apoptosoma (Cecconi, 1999) y la subsecuente activación de las caspasas y muerte celular.

El segundo modelo establece que algunas BH3-only pueden actuar “por encima” de las Bcl-2, mientras que otras actúan por debajo. La BH3-only tBid es secuestrada por Bcl-xL, y cuando tBid es desplazada por otra proteína BH3-only (como Bad)

queda libre para activar a Bax, que sucesivamente oligomeriza en la membrana mitocondrial facilitando la salida de proteínas proapoptóticas (Figura 11B).

El último modelo contempla que Bcl-xL puede unirse e inactivar y secuestrar a Bax o puede unirse a tBid para evitar la activación que esta produce en Bax (Figura 11C). Ambas interacciones ocurren cuando Bcl-xL se encuentra integrada en la membrana mitocondrial (Basáñez and Hardwick, 2008; Billen *et al.*, 2008; Gelinas and White, 2005).

### **2.3. Relevancia en cáncer.**

Dado que la densidad celular de los tejidos depende directamente del balance existente entre la apoptosis (y otras formas de muerte celular) y la proliferación celular, la desregulación de este balance es el origen de multitud de enfermedades. Entre ellas, una de las más estudiadas es el cáncer. El cáncer es definido por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como un proceso de crecimiento y diseminación descontrolado de células. En España afectó a 215.534 personas durante el año 2012, según el último informe de la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM), y su previsión para 2015 es de 227.076 casos, lo que implica un incremento de más del 5%.

Durante el desarrollo del tumor, las células implicadas sufren una serie de cambios que les confieren la capacidad de evitar las barreras anticancerígenas con las que cuenta el organismo (Figura 12). La autosuficiencia en cuanto a factores de crecimiento y la insensibilidad a factores de parada del crecimiento, evitan la dependencia de las señales del resto del tejido para poder dividirse.



**Figura 12: Características de la transformación en célula tumoral.** La mayoría de los tumores adquieren el mismo conjunto de capacidades durante su desarrollo aunque las adquieren de formas distintas. La imagen representa las seis propiedades adquiridas más características de los tumores. Autosuficiencia en factores de crecimiento, potencial replicativo ilimitado, evasión de la apoptosis e insensibilidad frente a señales contrarias al crecimiento tienen como resultado el crecimiento descontrolado del tejido transformado. La angiogénesis sostenible y la invasión de tejido y metástasis son características fundamentales para el crecimiento del tumor y su migración del tejido de su lugar de origen a un tejido nuevo (metástasis).

Imagen modificada de Hanahan and Weinberg, 2000.

Así pues, la evasión de la ruta apoptótica, inducida por señales internas (daños en el ADN, por ejemplo) o externas, evita la eliminación de células dañadas y parcial o totalmente transformadas en tumorales (Hanahan and Weinberg, 2000). Dicha evasión es en muchos casos llevada a cabo mediante la sobreexpresión de proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2. Sin duda, la inmensa mayoría de tumores presenta un proteoma desregulado en cuanto a los miembros de la familia Bcl-2 se refiere. También es muy frecuente encontrar mutaciones de pérdida de función en las proteínas Bcl-2 proapoptóticas (ya sean Bak y Bax) o las BH3-only, consideradas genes supresores de tumores.

## 2.4. Relevancia en isquemia cerebral.

Las proteínas de la familia Bcl-2 han sido también relacionadas con los modelos de I/R y excitotoxicidad. Especialmente, las lesiones neuronales que inducen una muerte neuronal más bien tardía, suelen deberse a la activación transcripcional y postranscripcional de proteínas proapoptóticas de esta familia como Puma, Bid y Bim (Concannon *et al.*, 2010; Konig *et al.*, 2007; Steckley *et al.*, 2007).

### 2.4.1. Bcl-2

Estudios realizados con animales han llevado a la conclusión de que la sobreexpresión de Bcl-2 protege las neuronas y reduce el área dañada del hipocampo

frente a la excitotoxicidad por NMDA (Wong *et al.*, 2005). También protege a través de la reparación del ADN y del estrés oxidativo presente en isquemia (Deng *et al.*, 1999). De la misma manera, ratones sin Bcl-2 tienen mayor estrés oxidativo y alteraciones en los antioxidantes del cerebro. Además, ratones que sobreexpresan Bcl-2 muestran una hipertrofia del sistema nervioso por un descenso de la muerte celular pero también un incremento sustancial (50%) de la supervivencia tras isquemia permanente inducida por oclusión de la arteria media cerebral (MCAO del inglés *Middle Cerebral Artery Occlusion*, Martinou *et al.*, 1994). Por último, se ha comprobado que Bcl-2 tiene una función fundamental en la regulación del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, disminuyendo la entrada del ión en el retículo (Rudner *et al.*, 2002).

### 2.4.2. Bcl-xL

Bcl-xL tiene una homología realmente alta a Bcl-2. Esta proteína está sobreexpresada en neuronas en desarrollo y su eliminación en estas fases provoca muerte masiva por apoptosis y como consecuencia, la muerte del embrión a día 13 (Akhtar *et al.*, 2004; Motoyama *et al.*, 1995). La sobreexpresión de esta proteína inhibe la actividad caspasa 3 y 9 en I/R (Cao *et al.*, 2002).

Bcl-xL juega un papel fundamental en el control de la liberación de neurotransmisores junto con Drp-1 en neuronas del hipocampo (Li *et al.*, 2008a). Y parece que también es crucial controlando los procesos de fusión y fisión mitocondrial (Berman *et al.*, 2009).

En conjunto, podemos concluir que Bcl-xL es fundamental para el SNC (Sistema Nervioso Central) y que las funciones que desarrolla pueden ser cruciales para la respuesta frente a I/R.

### 2.4.3. Mcl-1

La supresión de Mcl-1 es letal en el embrión de día 3,5 (Anilkumar and Prehn, 2014; Rinkenberger *et al.*, 2000). Se conocen dos funciones diferentes en cuanto a su localización. Cuando se encuentra en la periferia de la MME actúa como una Bcl-2 canónica, es decir, que previene la activación y oligomerización de Bak y Bax (Chen *et al.*, 2007; Willis *et al.*, 2005). Mientras que cuando se encuentra en la matriz mitocondrial, contribuye a la respiración y síntesis de ATP (Perciavalle *et al.*, 2012).

Las proteínas de la familia Bcl-2, que tienen funciones tan esenciales para la viabilidad celular, han sido asociadas en los últimos años con un creciente número de patologías incluyendo cáncer y enfermedades autoinmunes (Droin and Green, 2004; Frenzel *et al.*, 2009). Por este motivo, la búsqueda de nuevos miembros de esta familia de proteínas es de una importancia crucial.



### 3. Apolipoproteínas L.

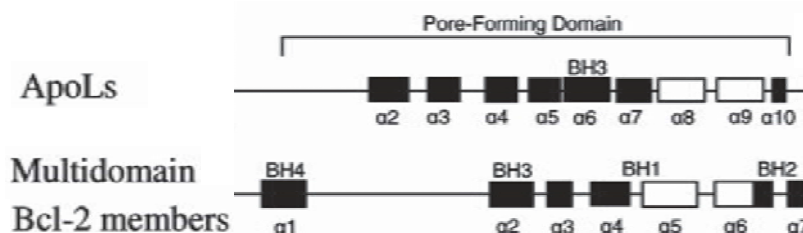
Los miembros de la familia de las apolipoproteínas L (ApoL) han sido considerados históricamente como proteínas relacionadas con el transporte de lípidos y el metabolismo. Esto es debido a que el primer miembro documentado, ApoL1, fue asociado con lipoproteínas de alta densidad (HDL, del inglés *High-Density Lipoprotein*). Parece ser que este es el único miembro de la familia que contiene el péptido señal que le permite ser exportada fuera de la célula. Por ello, las demás proteínas de este grupo se consideran citosólicas y como se describe más adelante, algunos de sus miembros han sido documentados con funciones más allá del transporte de lípidos.

#### 3.1. Relación con muerte celular.

Además de estar involucrada en el tráfico de lípidos, se ha descrito que ApoL1 es capaz de destruir los tripanocitos responsables de la enfermedad del sueño: *Trypanosoma brucei rhodesiense* y *T.b.gambiense* (Perez-Morga *et al.*, 2005). ApoL1 es capaz de despolarizar la membrana del lisosoma del parásito mediante la formación de un poro aniónico en su superficie. Esto produce un flujo de  $\text{Cl}^-$  hacia el interior del lisosoma que induce una alteración osmótica letal para el tripanosoma.

#### 3.2. Relación con las proteínas Bcl-2.

La familia ApoL tiene una distribución filogenética similar a la de la familia Bcl-2, ya que ambas están presentes solamente en metazoos y ausentes en bacterias y levaduras. Otra característica similar entre ambas familias es la presencia de una región que resulta esencial para la formación de poros en membranas biológicas (Figura 13). Todas las proteínas de la familia Bcl-2 contienen esta región aunque sólo Bax y Bak son capaces de abrir poros *in vivo* (Vanhollebeke and Pays, 2006). Tanto es así, que ApoL6 ha sido incluida en la búsqueda de posibles proteínas BH3-only desconocidas (Perez-Morga *et al.*, 2005) y descrita como capaz de formar poros iónicos en la mitocondria e inducir apoptosis (Liu *et al.*, 2005), siempre y cuando la proteína contenga el motivo BH3.



**Figura 13. Representación comparativa de la estructura de las familias Bcl-2 y ApoL.** La imagen muestra la región responsable de la formación del poro que comparten las dos familias de proteínas. Extraído y modificado de Vanhollebeke and Pays, 2006

En definitiva, se ha descrito que tanto ApoL1 como ApoL6 son capaces de comportarse de forma similar a las proteínas proapoptóticas Bcl-2 (Liu *et al.*, 2005; Vanhamme *et al.*, 2003; Wan *et al.*, 2008; Zhaorigetu *et al.*, 2011).

En células especialmente sensibles a las citoquinas, como son las células epiteliales, las ApoL se han descrito inducidas por TNF- $\alpha$  y por IFN- $\gamma$  (Horrevoets *et al.*, 1999; Sana *et al.*, 2005). IFN- $\alpha$  induce los transcritos de las ApoLs (Hayashi *et al.*, 2005; Stojdl *et al.*, 2003). También se suelen encontrar inducidas bajo infecciones víricas (Hayashi *et al.*, 2005; Stojdl *et al.*, 2003). Es interesante resaltar que la proteína ApoL2 es regulada bajo estas dos condiciones, el tratamiento con TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  y en la infección con el virus H3N2 (Liao *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2013).

### 3.3. Relación con autofagia.

La familia ApoL, como ya hemos descrito, mantiene ciertas similitudes con varios miembros de la familia Bcl-2, y una de ellas (Beclina-1) puede considerarse la capacidad para controlar y modular la autofagia. Por un lado, encontramos que ApoL6 es inducida en aterosclerosis y es responsable del bloqueo de la autofagia y la muerte por apoptosis de las células ateroscleróticas (Zhaorigetu *et al.*, 2011). Y por otro, se ha descrito que, tanto ApoL1 como ApoL6, son capaces de inducir muerte por autofagia en MEFs (del inglés *Mouse Embryonic Fibroblasts*) en determinadas circunstancias (Wan *et al.*, 2008; Zhaorigetu *et al.*, 2008).

### 4. Isquemia cerebral.

Según los datos del Grupo de Estudio de Enfermedades Cardiovasculares de la Sociedad Española de Neurología (GEECV-SEN), el ictus es la primera causa de mortalidad entre las mujeres españolas y la segunda en los varones. La incidencia aumenta proporcionalmente con la edad, sobre todo a partir de los 55 años. Al año se detectan 120.000 casos nuevos, y según la Federación Española de Ictus, en España, cada 6 minutos se produce un accidente cerebrovascular. Estamos por tanto frente a un serio problema para la sociedad occidental debido al fuerte aumento de la media de edad en estos países.

#### 4.1. Etiología y tratamiento.

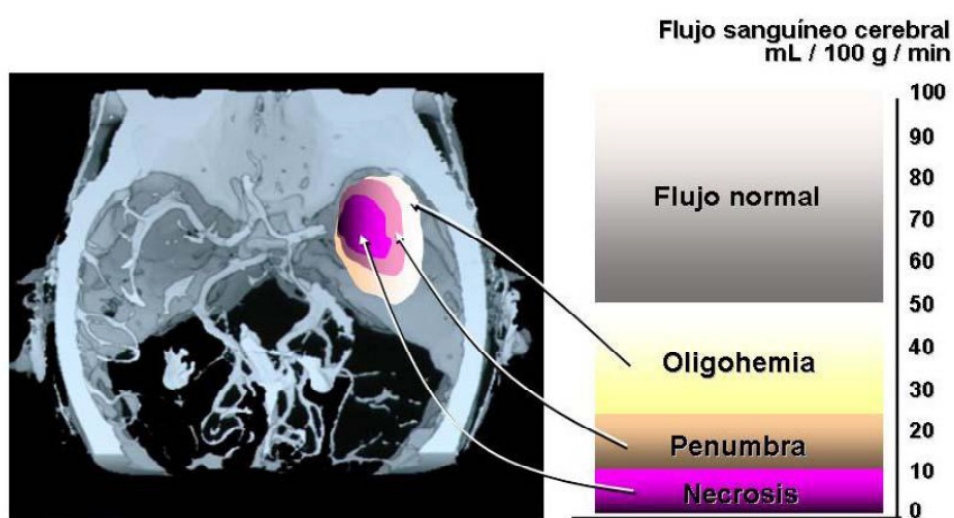
La isquemia cerebral (o ictus) es un proceso repentino de insuficiencia en la irrigación sanguínea del cerebro que se debe a un taponamiento en un vaso sanguíneo por un tromboembolismo. Los efectos de estos episodios pueden ir desde una pronta y completa recuperación hasta la muerte del individuo, pasando por graves secuelas neurológicas de por vida.

Cuando sucede un taponamiento de un vaso, se produce una reducción parcial o completa del volumen o caudal del torrente sanguíneo, afectando al tejido circundante. El área afectada viene determinada por el tamaño y localización del vaso ocluido. Si este evento sucede en un pequeño capilar, el efecto será menor que si ocurre en una arteria aún por ramificarse, ya que el recorrido afectado es mucho menor en el capilar que en la arteria. Si la oclusión es de carácter reversible en menos de 24 horas, existe una gran probabilidad de que no queden secuelas neurológicas importantes (Diez-Tejedor *et al.*, 2001).

La obstrucción del vaso ocasiona un gradiente de daños en la zona infartada, con una isquemia severa alrededor del vaso afectado, denominado “núcleo necrótico”, y una zona isquémica leve o menos pronunciada, que rodea al núcleo y que se denomina zona de penumbra (Figura 14). Las células del núcleo necrótico no reciben flujo sanguíneo, mientras que en la penumbra, al recibir un flujo sanguíneo (que aunque es ínfimo, puede resultar suficiente), las células conservan una actividad metabólica

mínima que preserva su integridad estructural durante un determinado periodo de tiempo (Astrup *et al.*, 1981).

El núcleo necrótico deja instantáneamente de ser irrigado y sufre una destrucción masiva del parénquima de forma rápida, mientras que la zona de penumbra no. La importancia de la zona de penumbra isquémica reside en que las células que han sobrevivido a la isquemia, aunque son realmente vulnerables a las condiciones posteriores al ictus, podrían ser recuperadas con el tratamiento adecuado en el momento en el que se restaura el flujo sanguíneo (Back, 1998).



**Figura 14.** Esquema que representa de las diferentes zonas afectadas tras un evento isquémico. En la imagen podemos distinguir la zona de necrosis, donde la muerte es masiva y el flujo sanguíneo es muy bajo y la zona de penumbra, que es la región en la que las neuronas aún pueden ser recuperadas mediante una rápida intervención. En la zona de oligohemia no se induce muerte celular. Figura extraída de Castillo and Leira, 2001.

Debido a la naturaleza de la afección, el tratamiento utilizado hasta la fecha es la administración de activador tisular del plasminógeno (tPA del inglés *tissue Plasmigen Activator*) que promueve la disgregación de los coágulos sanguíneos al inducir la conversión del plaminógeno en plasmina. Recientemente se han aprobado dos sistemas de perfusión del caudal y eliminación de la oclusión que son TREVO y Solitaire, pero hasta la fecha no se ha demostrado que estos sistemas sean más efectivos que el tratamiento clásico con tPA (Ciccone and del Zoppo, 2014).

Actualmente no existe un tratamiento efectivo para hacer frente a los daños provocados por infarto cerebral o ictus. Aunque la inmensa mayoría de los ensayos

clínicos que están actualmente en curso en esta área se llevan a cabo con compuestos trombolíticos y anticoagulantes, existen diversos compuestos que han sido propuestos como neuroprotectores, esencialmente antioxidantes. Sólo unos pocos han obtenido resultados favorables en los ensayos clínicos (Jin, 2003; Shinohara *et al.*, 2009). La citocolina, por ejemplo, se comercializa como tratamiento frente al ictus con prometedores resultados preliminares (Saver, 2008; Warach *et al.*, 2000), pero en los ensayos clínicos, prácticamente todos los compuestos antioxidantes resultan inefectivos, tóxicos o incluso perjudiciales (Davalos *et al.*, 2012; Lees *et al.*, 2006; Rosso *et al.*; Shuaib *et al.*, 2007).

### **4.2. Descripción molecular de la cascada isquémica.**

La caída del flujo sanguíneo en el encéfalo desencadena una serie de fenómenos que, en algunos casos, son consecuencia unos de otros, o al menos están todos interrelacionados y son los causantes del daño neurológico asociado al ictus.

#### **4.2.1. Caída de ATP.**

En primer lugar, la ausencia o reducción del torrente sanguíneo en el tejido conlleva una implicación directa evidente: sin sangre no hay nutrientes, oxígeno, ni factores tróficos. Las neuronas no son capaces de metabolizar multitud de nutrientes, lo que las hace muy dependientes de la glucemia. También son muy dependientes de los niveles de oxígeno, pues resultan fundamentales para poder metabolizar la glucosa y con la caída de la presión sanguínea, los niveles de oxígeno y glucosa se reducen drásticamente en el tejido afectado por un ictus. La hipoxia bloquea el uso de la cadena de transporte de electrones ya que no hay aceptor final de electrones, con lo que los niveles de ATP se ven drásticamente reducidos. Una gran variedad de procesos celulares son dependientes de ATP, con lo que a partir de este punto, diferentes mecanismos se verán afectados.

#### **4.2.2. Aumento del estrés oxidativo.**

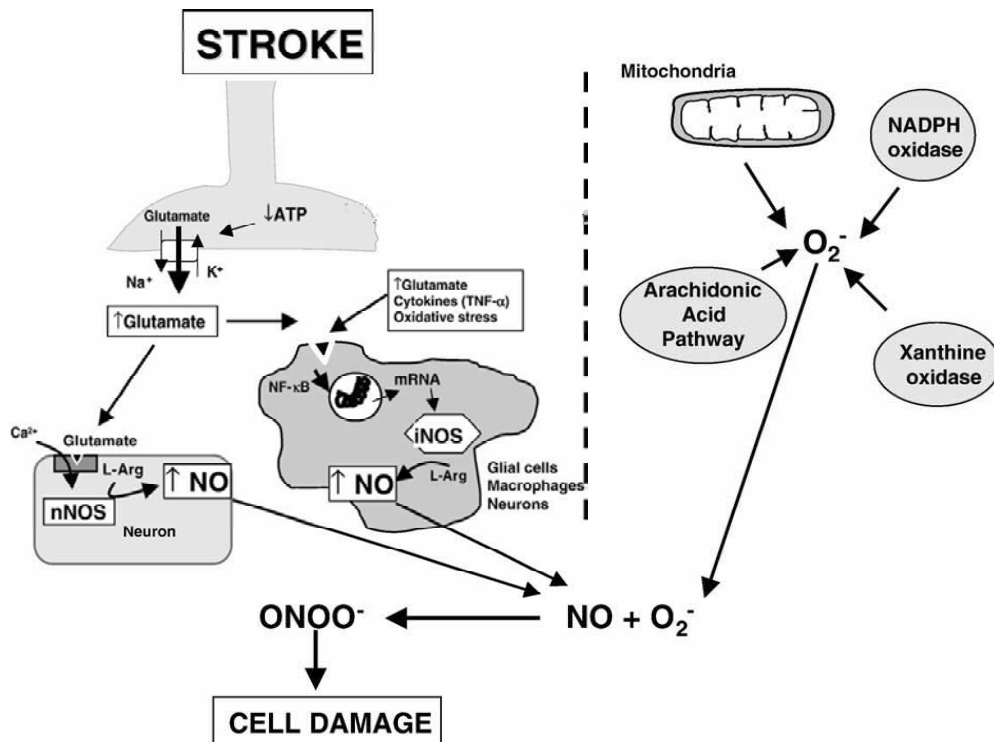
Con la bajada del flujo de sangre y la caída de ATP, los procesos dependientes de ATP como es la bomba ATPasa de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , no pueden seguir funcionando y el potencial iónico generado se disipa. La caída del potencial produce un influjo de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Ca}^{2+}$  y una salida de  $\text{K}^+$  al exterior celular. La descompensación aniónica,

además provoca una modificación osmótica que conduce a la hinchazón celular. El aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  en sí ya es un peligro porque dará lugar a la liberación descontrolada de glutamato y la consecuente excitotoxicidad (ver más adelante), bloqueo de la síntesis de ATP y puede además activar la vía NF- $\kappa$ B de las células del sistema inmunitario cercanas. Esta cascada de señalización produce un aumento en los niveles de óxido nítrico (NO, del inglés *Nitric Oxide*) a través de la inducción de la síntesis de la enzima NOS (Óxido Nítrico Sintasa). La superproducción de NO tras isquemia está descrita tanto en pacientes (El Kossi and Zakhary, 2000; Krupinski *et al.*, 1998) como en los modelos animales de I/R (Malinski *et al.*, 1993; Zhang *et al.*, 1995).

El aumento de calcio intracelular puede inducir directamente en las neuronas la síntesis de óxido nítrico mediante la NOS, ya que la unión de NOS al  $\text{Ca}^{2+}$  induce la potenciación de su actividad generando altas cantidades de NO. Se ha comprobado que pasados 10 minutos tras la hipoxia, esta enzima está inducida y que ratones con la NOS silenciada genéticamente son más resistentes a la isquemia tanto permanente como transitoria (Huang *et al.*, 1994). La generación de citoquinas proinflamatorias tras la isquemia (Rothwell and Relton, 1993) también puede inducir la síntesis de NO en las células de la glía (Figura 15, Galea *et al.*, 1992).

El aumento de calcio también es responsable de la activación de la fosfolipasa A (PLA<sub>2</sub>) que produce altas cantidades de ácido araquidónico, y la degradación de este produce el anión superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ). Por último, la vía de degradación de ácidos nucleicos mediante la enzima xantina oxidasa (quien convierte la hipoxantina a xantina y esta a urea) también contribuye a la formación de especies reactivas del oxígeno generando  $\text{H}_2\text{O}_2$  que será descompuesto produciéndose  $\text{O}_2^{\cdot-}$  (Figura 15).

La unión del  $\text{O}_2^{\cdot-}$  con el NO produce el radical libre peroxinitrito ( $\text{ONOO}^{\cdot-}$ ) que es muy reactivo e inmediatamente después de ser sintetizado puede reaccionar con radicales sulfhidrilo, grupos tiólicos, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (Zhang *et al.*, 1994), alterando la estructura y/o composición de proteínas, fosfolípidos de membrana y ADN. Estas alteraciones bruscas pueden ser (y a menudo son) letales para la célula. Los radicales peroxinitrito pueden incluso alterar la barrera hematoencefálica y provocar un edema cerebral (Moro *et al.*, 2005).

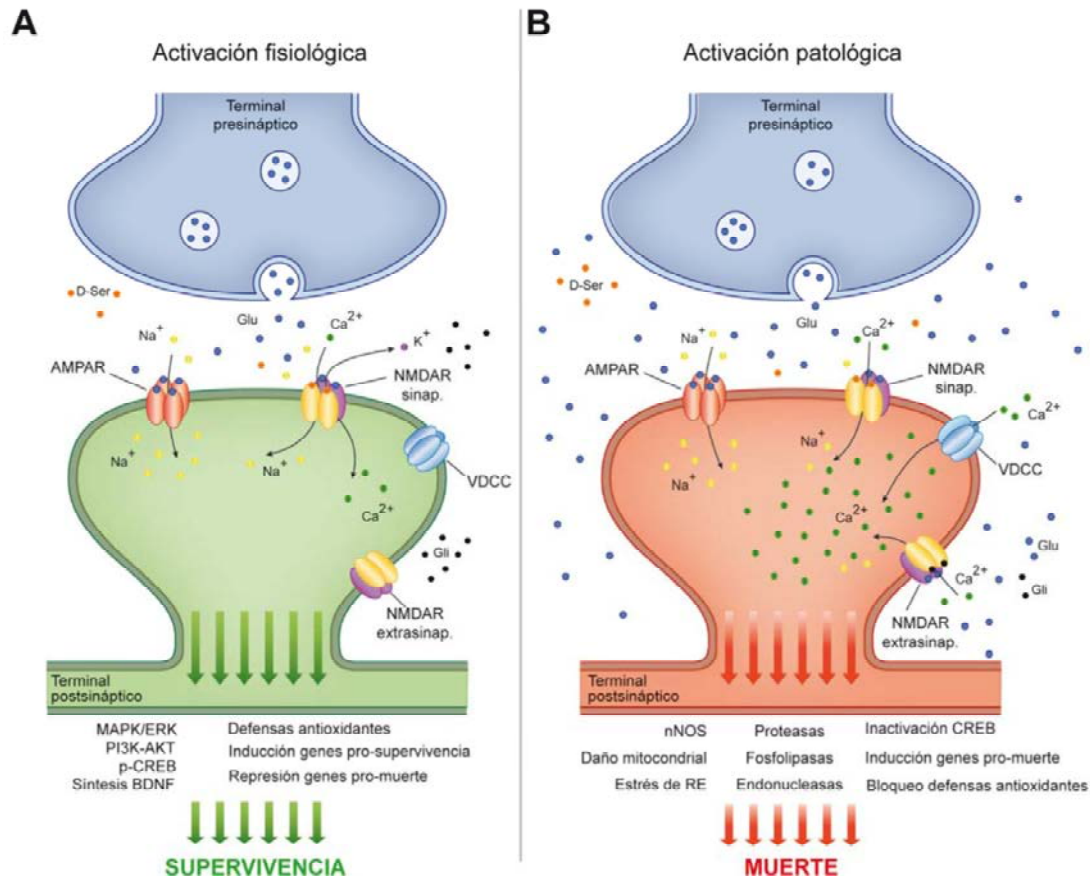


**Figura 15. Representación esquemática de los principales focos de producción de ROS en isquemia.** La imagen muestra cómo la isquemia provoca una caída en los niveles de ATP y la liberación de glutamato. El aumento del glutamato induce de forma indirecta la acumulación de NO tanto en neuronas como en la glía. El NO reacciona con el anión O<sub>2</sub><sup>-</sup> acumulado en el citoplasma. La acumulación de O<sub>2</sub><sup>-</sup> se debe a la liberación del producido en la mitocondria, a la degradación de ácidos nucleicos y por la acumulación de ácido araquidónico a través de la PLA<sub>2</sub>. La unión del NO con O<sub>2</sub><sup>-</sup> forma el anión peroxinitrito cuya acumulación resulta letal para la célula. Figura adaptada de Moro *et al.*, 2005.

#### 4.2.3. Excitotoxicidad.

El glutamato es el principal neurotransmisor del SNC, que puede unirse y activar los receptores NMDA, AMPA y los receptores de Kainato (Fykse and Fonnum, 1996). Pero en determinadas circunstancias, cuando hay una sobreexposición al glutamato, se produce excitotoxicidad (Olney *et al.*, 1972; Sheldon and Robinson, 2007) que está muy presente en casos de isquemia (Castillo *et al.*, 1996). Los receptores NMDA son heterotetrámeros que están formados por dos subunidades GluN1 y dos GluN2. Existe un solo gen para GluN1 aunque mediante procesamiento alternativo se producen ocho variantes, mientras que del GluN2 hay cuatro genes que dan lugar a los distintos subtipos (GluN2A-D) (Stephenson, 2006). Aunque todos los subtipos pueden encontrarse en los NMDA, se suele considerar que la mayoría de los receptores NMDA sinápticos están formados por GluN1/GluN2A y que los extrasinápticos contienen GluN2B (Brassai *et al.*, 2014; Hardingham *et al.*, 2002). Durante la I/R, se ha comprobado que existe un papel dual de estos receptores

NMDA ya que la excitación de receptores con la subunidad GluN2B, tanto en la zona sináptica como en la extrasináptica, induce excitotoxicidad y muerte neuronal, mientras que la activación de los NR2A tiene un papel neuroprotector incrementando la viabilidad neuronal (Figura 16, Liu *et al.*, 2007)



**Figura 16. Activación fisiológica y patológica del NMDAR. Implicaciones en vías de supervivencia y muerte neuronal.** Representación esquemática de un terminal glutamatérgico mostrando la activación fisiológica (**A**) y patológica (**B**) del NMDAR por sus coagonistas, glutamato o NMDA, y glicina o D-serina. El glutamato es liberado a la brecha sináptica desde el terminal presináptico, mientras que la glicina llega por difusión pasiva desde otros terminales pertenecientes a neuronas glicinérgicas. La activación del NMDAR requiere además la eliminación del bloqueo ejercido por el catión  $\text{Mg}^{2+}$ . La activación, también por glutamato, de los AMPARs y la consecuente entrada de  $\text{Na}^{+}$  en el terminal postsináptico, induce la despolarización de la membrana y el desbloqueo del NMDAR por  $\text{Mg}^{2+}$ . En condiciones fisiológicas, la liberación de glutamato se restringe a la brecha sináptica, promoviendo exclusivamente la estimulación de los NMDARs sinápticos. Se produce una entrada moderada de  $\text{Ca}^{2+}$  y se induce la activación de rutas de señalización implicadas en supervivencia, como la vía de MAPK/ERK o PI3K-AKT, y el aumento de las defensas antioxidantes. La fosforilación del factor de transcripción CREB induce la expresión del factor neurotrófico BDNF y su receptor TrkB. En condiciones patológicas, la presencia masiva de glutamato en el espacio extracelular induce la activación de los NMDARs sinápticos y extrasinápticos. La entrada inicial de  $\text{Ca}^{2+}$  a través del NMDAR se ve agravada por la apertura de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje (VDCC) y la liberación de este catión desde los reservorios del RE y la mitocondria. El aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular es tóxico para la neurona ya que promueve la activación de proteasas, fosfolipasas, endonucleasas y enzimas implicadas en la síntesis de óxido nítrico (nNOS), y aumenta el estrés reticular y el daño mitocondrial. Además, se induce el bloqueo de la actividad transcripcional de CREB y la estimulación de vías de muerte celular. Imagen y pie de imagen tomados de Reoyo Rodríguez, 2012.



La muerte neuronal por excitotoxicidad inducida tras I/R se produce básicamente a través de los receptores NR2B y está mediada por un flujo excesivo de  $\text{Ca}^{2+}$  (Choi, 1985; Choi, 1987; Choi, 1988). Tanto es así, que se han realizado ensayos clínicos tratando de bloquear la acción de los receptores NMDA y revertir la muerte por excitotoxicidad inducida por la I/R (Davis *et al.*, 2000; Diener *et al.*, 2002; Dyker *et al.*, 1999).

### 4.3. Modelos empleados en bibliografía y sus conclusiones.

Los modelos empleados en el estudio de la isquemia cerebral han sido muy variados ya que las condiciones a recrear son altamente complejas. Las neuronas tienen una respuesta que varía en función del tipo y duración del estímulo isquémico. Así, la muerte neuronal ocurre en una ventana mayor o menor de tiempo y puede desencadenarse a través de necrosis, apoptosis, autofagia o necroptosis (Broughton *et al.*, 2009; Degterev *et al.*, 2005; Lipton, 1999; Rami and Kogel, 2008).

*In vitro*, los modelos utilizados dependen de varios factores. El primero es la procedencia de las neuronas, tanto del animal del que provienen como del estadio en el que se obtienen (no es similar si provienen de embriones o son neuronas de adulto). Otro aspecto importante es la metodología utilizada para mimetizar las peculiares condiciones fisiológicas que se desarrollan en un episodio isquémico. Estas condiciones son básicamente la presión de oxígeno, el medio utilizado para simular la retirada de nutrientes (existen diferentes ampliamente utilizados en la literatura como EBSS sin glucosa, DMEM sin glucosa, ICSF, entre otros) y el periodo de duración de la isquemia y su recuperación (el equivalente a la reperusión *in vivo*).

La presión de oxígeno utilizada normalmente suele estar entre la anoxia total y el 1,5% de oxígeno. Entre los medios para inducir falta de nutrientes, existen algunos, como el DMEM sin glucosa o el medio EBSS, comúnmente utilizados en investigación (estudios de metabolismo celular y de autofagia, respectivamente). Otros, como el medio ICSF o ACSF, son medios más concretos y su uso está prácticamente restringido al estudio de isquemia. ICSF mimetiza las condiciones de pH y concentración de sales que se producen en la región infartada (Rytter *et al.*,

2003). Como es evidente, la duración del estímulo isquémico es también fundamental para el resultado en la población neuronal. Los tratamientos más comunes en la bibliografía van desde los 45 minutos hasta las 4 horas de tratamiento. Aquí habría también que matizar que el objeto de estudio en tratamientos muy largos no es el modelo I/R, sino simplemente estudiar las consecuencias directas producidas por la isquemia. La reperusión se está estudiando hasta las 24 o 48 horas.

*In vivo*, los modelos de isquemia focal más utilizados están son MCAO temporal o permanente. Este sistema es poco invasivo (comparado con otros modelos en los que se produce isquemia global) y tiene la ventaja de que el área infartada es reproducible. El método consiste en introducir una sutura a través de la carótida interna que llegará hasta la arteria cerebral media. Simultáneamente, se realiza la oclusión mediante ligadura de las ramas de la carótida externa y de las ramas extracraneales de la interna. El tapón es fácilmente eliminado (tanto la sutura como los ligamientos) permitiendo la reperusión sanguínea si se desea.

Buena parte de los trabajos publicados en I/R atribuyen una gran importancia a la apoptosis como tipo de muerte neuronal en este modelo (Malagelada *et al.*, 2005) otorgando papeles clave a la activación de caspasas (Badiola *et al.*, 2011). Además se ha descrito que la viabilidad neuronal se puede recuperar con el tratamiento de inhibidores de caspasas (Fink *et al.*, 1998), suprimiendo las proteínas BH3-only que puedan estar iniciando la cascada (Plesnila *et al.*, 2002) y aumentando las proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2 (Cao *et al.*, 2002).

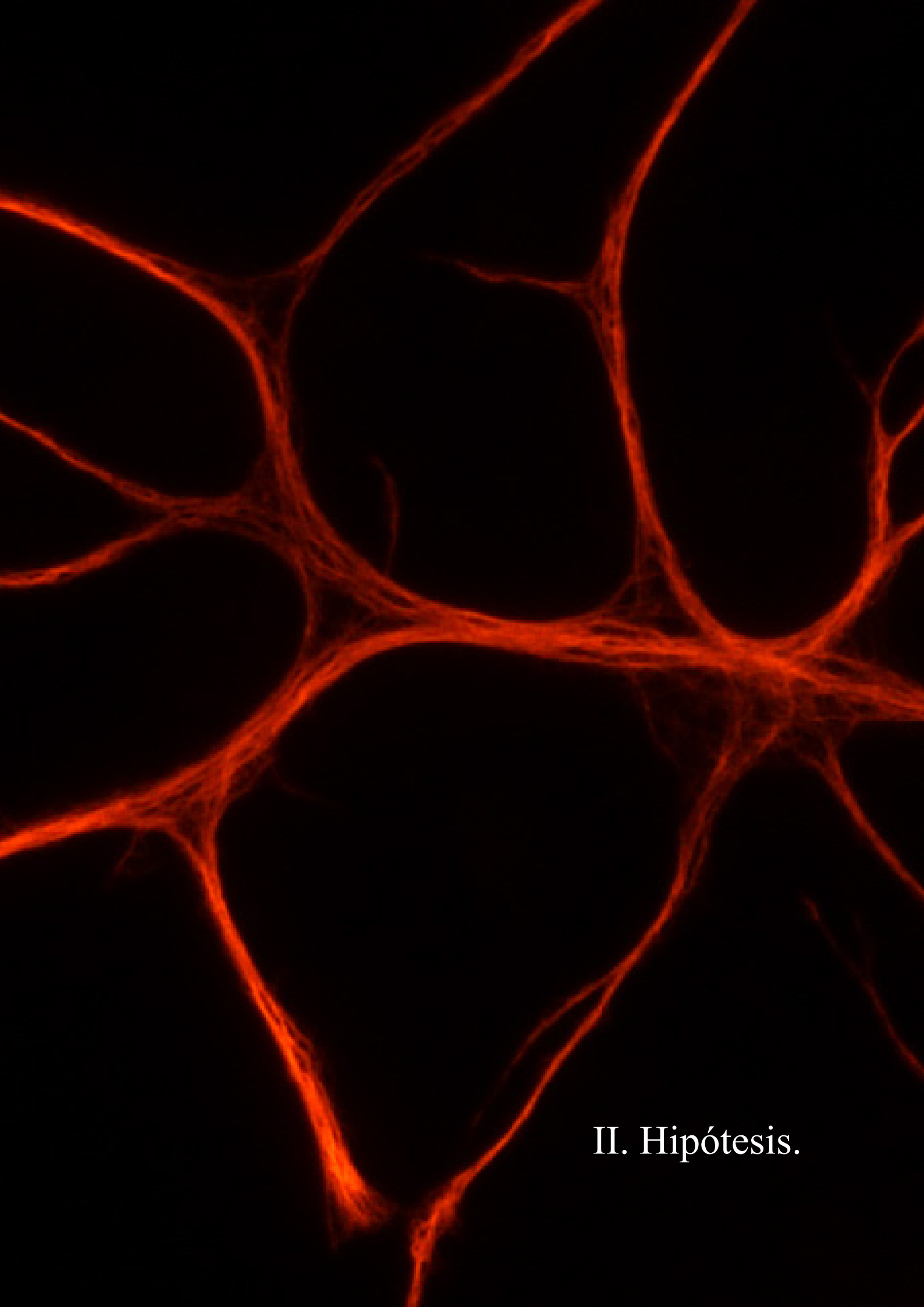
La muerte por la apertura de PPTM está muy de actualidad en la investigación en el campo de la I/R ya que se ha identificado que el inhibidor de PPTM, ciclosporina A, (CsA) protege frente a la I/R *in vitro* (Yu *et al.*, 2013) y es capaz de reducir el volumen de cerebro infartado cuando es preincubada (Khaspekov *et al.*, 1999; Vaseva *et al.*, 2012).

También se ha descrito como neuroprotector el inhibidor de la necroptosis necrostatina-1 (Degterev *et al.*, 2005), incluso se ha probado en combinación con inhibidores de apoptosis (Xu *et al.*, 2010).

La muerte celular debido a la isquemia parece estar más relacionada con la reperusión postisquémica que con la isquemia en sí misma. Es decir, la neurodegeneración viene dada y ocurre durante el periodo posterior a la isquemia, en el momento en el que el torrente sanguíneo vuelve a fluir (Halestrap and Richardson, 2015).







II. Hipótesis.

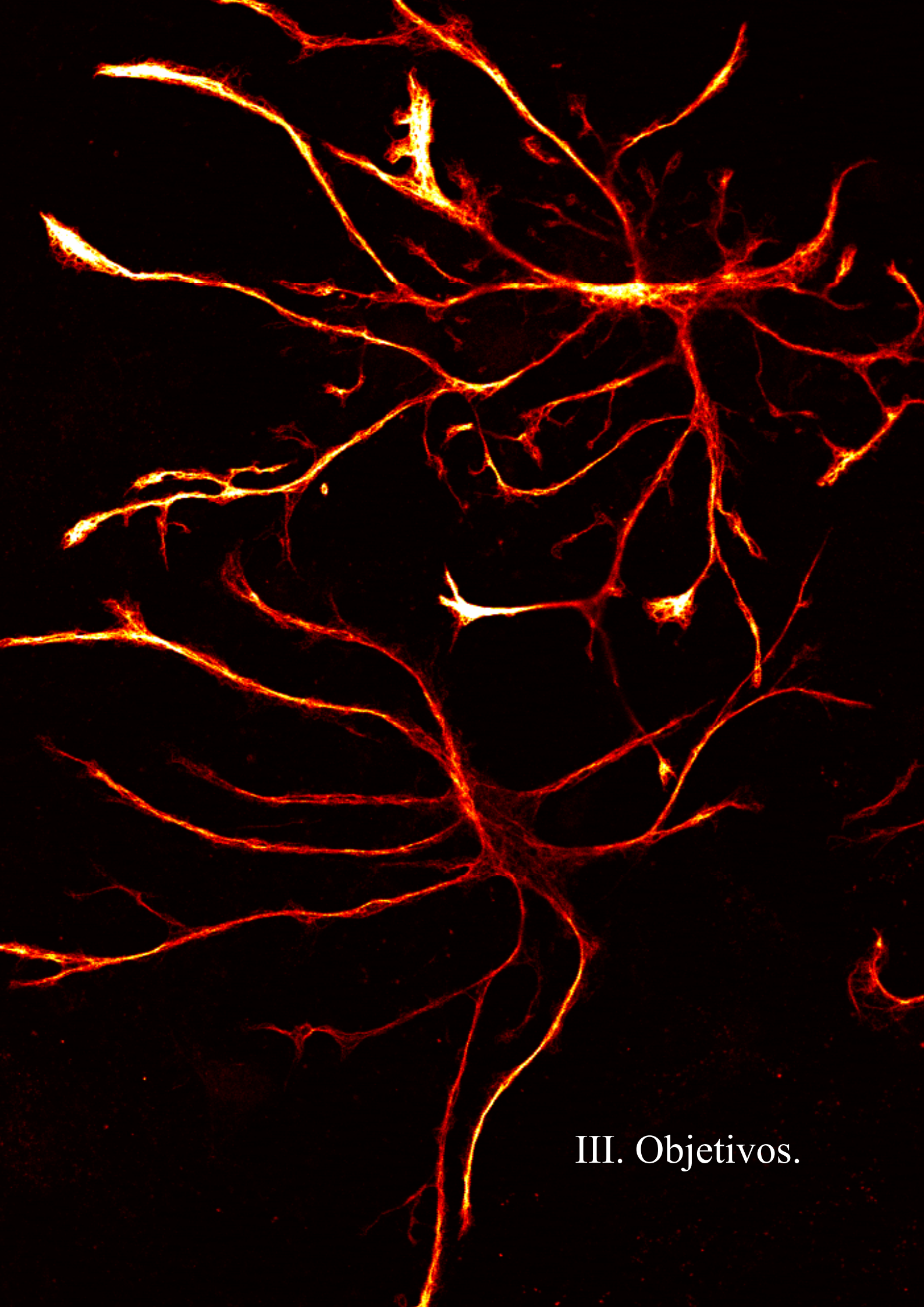


El trabajo bioinformático previo en el laboratorio, ha dado como resultado la detección de una proteína de bajo peso molecular que tiene una región de su secuencia muy similar al dominio BH3. Dado que no ha sido descrita anteriormente como miembro de la familia Bcl-2, nuestra hipótesis inicial de trabajo es que esta proteína pueda inducir muerte apoptótica a través de la vía mitocondrial.

Por otro lado, la literatura sobre la causa de muerte de las neuronas tras un accidente cerebrovascular es confusa y contradictoria.. Nuestra hipótesis contempla un escenario en el que diversos tipos de muerte celular se hallan involucrados pudiendo ser incluso consecuencia unos de otros.





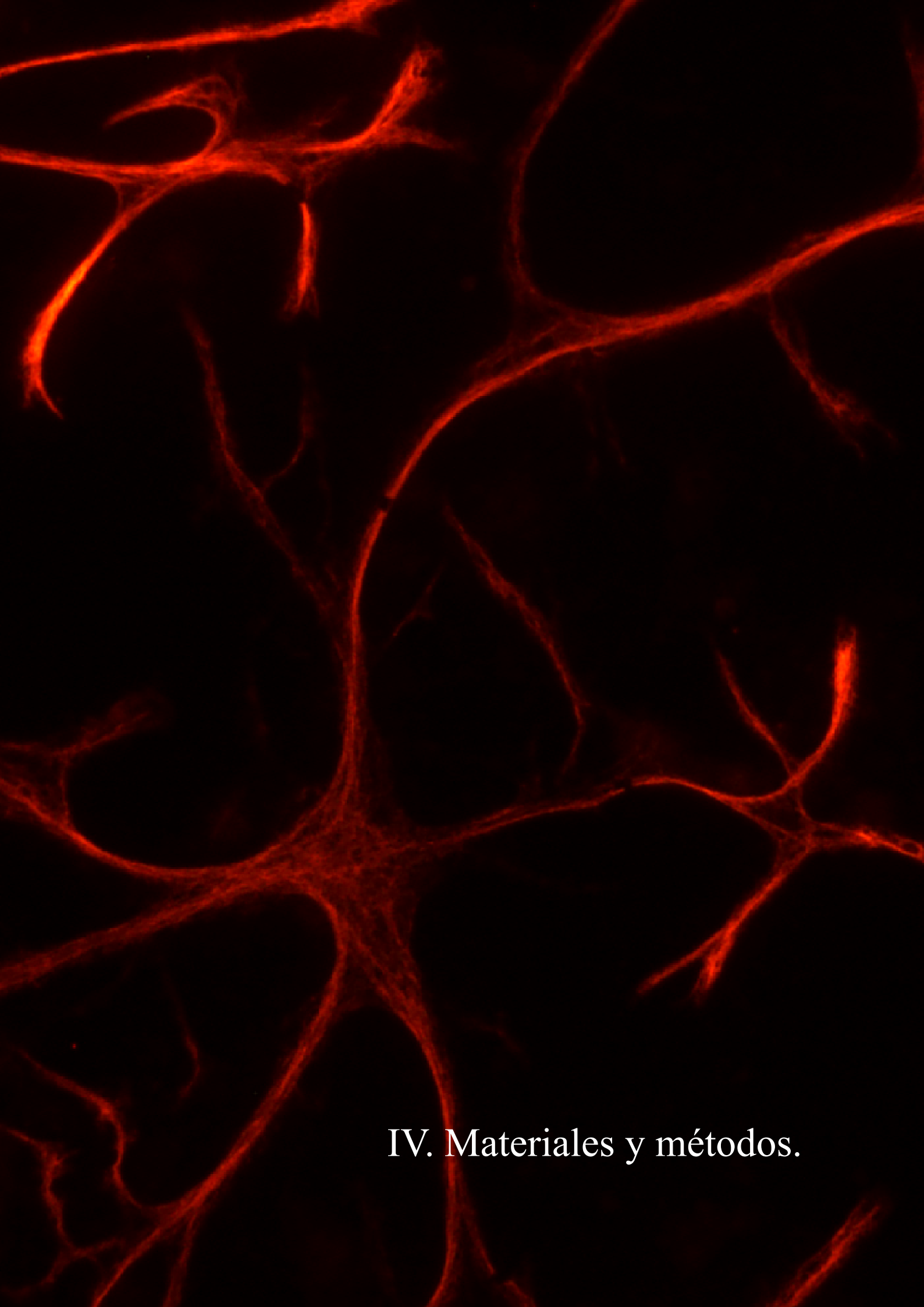


III. Objetivos.



1. Estudiar el posible papel como proteína BH3-only de la Apolipoproteína L2.
  - 1.1. Describir el posible papel de ApoL2 en la regulación de la apoptosis por la vía mitocondrial.
  - 1.2. Describir el posible papel de ApoL2 en la regulación de la apoptosis por la vía extrínseca.
  - 1.3. Estudiar las posibles interacciones de ApoL2 con miembros de la familia Bcl-2.
2. Caracterización del tipo de muerte celular de las neuronas en el modelo OGD/R.
3. Ensayo de inhibidores de la muerte celular dirigidos a prevenir la muerte inducida por OGD/R.





#### IV. Materiales y métodos.



## **1. Mantenimiento de la colonia y cruces F1.**

En todos los experimentos de isquemia cerebral se han utilizado las neuronas corticales primarias de embriones de ratón como modelo celular. La obtención de estas células fue realizada a partir de embriones de 18 días de la cepa murina C57BL/6J (Charles River). Para el mantenimiento de la colonia de ratones, se contó de forma habitual con cuatro ratones macho y cuatro hembras, que llamamos parentales. Los ratones parentales fueron cruzados para obtener la F1, de la que partiremos para obtener los embriones. Estos ratones fueron cambiados aproximadamente cada seis meses para mantener la capacidad reproductiva de la colonia.

Un día antes de que se cruzasen los ratones (siempre F1) se puso algo de viruta de la jaula del macho dentro de la jaula de la hembra para preparar el celo. Al día siguiente, se puso la hembra en la jaula del macho. Al día siguiente, por la mañana, se comprobó la existencia del tapón blanquecino en la vagina. Cuando observamos el tapón en la hembra, consideramos que la hembra estaba preñada y este era el día 0 de embarazo.

En algunas ocasiones, la hembra reabsorbe el tapón y con ello el embarazo. Esto suele ocurrir con esta cepa si la hembra está estresada o a veces, en el primer embarazo de la hembra. Si la fecundación ha sido al poco de poner la hembra en la jaula y se ha tardado demasiado en mirar el tampón, puede ocurrir que el tapón ya no esté (sólo es visible temporalmente) por lo que no sabremos si la hembra está embarazada. Por este motivo y para evitar confusiones, las hembras se pesaron antes de ser cruzadas y a día 4 y 7 después del cruce. La diferencia de peso en los 3 primeros días cuando la hembra está embarazada es de aproximadamente 0,6-1,5 gramos, pero siempre hacíamos el seguimiento hasta el día 7 donde es muy evidente.

### **1.1. Aislamiento y cultivo de neuronas.**

Para extraer, aislar y cultivar las neuronas corticales, las hembras embarazadas se sacrificaron por dislocación en día 16-18 de gestación (E16-E18).



Primero, se colocaron todos los embriones en tampón de disección (Tabla 1) frío y se decapitaron uno a uno, poniendo las cabezas en una placa de 100 mm de diámetro (Falcon, Becton) con medio de disección frío y sobre hielo. A continuación, se sujetó la cabeza de cada embrión por la parte rostral con las pinzas curvas mientras se realizaron dos cortes laterales en la parte antero-basal del cráneo. Se extrajeron los cerebros deslizándolos suavemente la parte lateral de las tijeras sobre la zona rostral del cráneo. Bajo lupa, se eliminó el tronco encefálico y se dividieron los hemisferios para facilitar la retirada de las meninges y del hipocampo. Todos los fragmentos corticales extraídos de los embriones se juntaron y se unificó todo en una sola muestra.

A continuación, se centrifugó a 1.000 rpm, 5 minutos y se añadieron 2 ml de tampón de disección. Se disgregó el tejido añadiendo 150  $\mu$ l de tripsina por cada 8-9 embriones y se incubó 17 minutos a 37 °C agitando cada 5 minutos.

Se añadió DNasa A (Qiagen) 10 mg/1,5 ml de tampón de disección y se incubó a 37 °C, 2 minutos. Se centrifugaron de nuevo y se resuspendieron suavemente en medio de siembra (Tabla 1). Entonces, se filtraron con un filtro de 70  $\mu$ m y se contaron usando azul de Tripán (Sigma). Se sembraron posteriormente en placas previamente polilisinadas atendiendo a las siguientes cantidades:  $3 \times 10^4$  células en placas de 96 pocillos, en un volumen final de 100  $\mu$ l;  $2 \times 10^5$  células en placas de 24 pocillos, en un volumen final de 500  $\mu$ l;  $4 \times 10^5$  células en placas de 12 pocillos, en un volumen final de 1 ml; y  $1 \times 10^6$  células en las de 6 pocillos; con volumen final de 1 ml.

Pasado el primer día de incubación, se retiró el medio de siembra y se sustituyó por una mezcla 1:1 de medio de siembra y medio de cultivo (Tabla 1). A esta mezcla añadimos Ara-C (600 nM, Sigma). Al tercer día después de la siembra, se cambió el medio de cultivo por medio de cultivo nuevo.

## 2. Líneas Celulares.

HeLa: línea celular de cáncer cérvico-uterino humano. Fueron obtenidas a través del laboratorio de Douglas Green.

HEK 293: células embrionarias de riñón de origen humano. Fueron amablemente cedidas por el laboratorio del Dr. Ramón Alemany.

HEK 293T: células embrionarias de riñón de origen humano. Han sido modificadas para que expresen constitutivamente el antígeno T grande del virus de simio 40 (SV40). Estas células han sido utilizadas por su facilidad de transfección.

MEF: fibroblastos embrionarios de ratón. Estos fibroblastos proceden de ratones comúnmente conocidos como silvestres (de genotipo normal, no alterado o no elegido por peculiaridad alguna) que suelen llamarse de forma abreviada WT (del inglés *Wild Type*), o deficientes en los genes Bax y Bak que serán llamados DKO (del inglés *Doble Knock Out*). Ambas líneas celulares provienen de la misma inmortalización mediante SV-40 y fueron amablemente donadas por el Dr. Stanley J. Korsmeyer.

Las líneas celulares se cultivaron en medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagles's Medium*, Gibco) sin piruvato, con alta concentración de glucosa (25 mM), enriquecido con 2 mM de glutamina (Gibco), penicilina (200 mg/ml, Gibco), estreptomycin (100 mg/ml) (la mezcla penicilina, estreptomycin y glutamina a estas concentraciones será llamada a partir de ahora PSQ) y un 10% de suero bovino fetal (FBS del inglés *Fetal Bovine Serum*) inactivado (Gibco). Se mantuvieron en placas de 100 mm para cultivo celular (Falcon, Corning), a 37 °C y una concentración de CO<sub>2</sub> del 5%. Las líneas celulares se fueron manteniendo en cultivo dividiéndolas dos o tres veces por semana, utilizando tripsina-EDTA 0,05% (Gibco) y se mantuvieron en uso hasta las seis u ocho semanas. Durante la primera semana de cultivo, las células fueron congeladas primero a -80 °C y después a -195 °C en nitrógeno líquido.

### 3. Tratamientos.

Antes de realizar los tratamientos, las células fueron lavadas dos veces con el medio que sirvió de vehículo para el tratamiento. En todos los casos, salvo que se indique lo contrario, el procedimiento seguido con los controles fue el mismo que para las muestras problema.

Para poder realizar comparaciones legítimas, en todos los casos en los que se administró una droga a las células, a los controles se les administró el mismo volumen de sustancia vehículo de la droga. En el caso en el que haya más de un volumen en el experimento, a los controles se les administrará el volumen mayor.

#### 3.1. Tratamiento de retirada de glucosa.

Se utilizó el medio de cultivo DMEM sin glucosa ni piruvato (Gibco), con 2 mM de glutamina añadida, como máximo, una semana antes del tratamiento. Las células se lavaron con el medio DMEM sin glucosa ni piruvato (Gibco) para eliminar los restos de glucosa que pudiera haber en el medio, y a continuación, se trataron con el mismo medio suplementado con PSQ, enriquecido con un 10% de FBS inactivado y dializado.

Para la diálisis del suero, primero se lavó la membrana de diálisis tres veces, con agua miliQ caliente y en agitación. Después, se rellenó la membrana con el FBS, y se sumergió en un volumen de PBS (del inglés *Phosphate Buffered Saline*, Biowest) 10 veces mayor que el contenido de suero. Se realizaron dos lavados de una hora en agitación. El tercer lavado se realizó a 4 °C, toda la noche. Después, se recogió el suero y se filtró con un filtro de 0,22 µm en condiciones de esterilidad, para evitar que el suero dializado contaminase los cultivos celulares.

### 3.2. Tratamiento de retirada de nutrientes y factores.

Para la inducción de muerte, se trataron las células con el medio carente de aminoácidos EBSS (*Earle's Balanced Salt Solution*, Gibco), suplementado con HEPES (Sigma) 25 mM, durante 24 horas. Antes de administrar el tratamiento EBSS-HEPES, las células fueron lavadas dos veces con EBSS.

Para la inducción de autofagia, las células fueron incubadas con el medio EBSS (Tabla 1) suplementado con HEPES 25 mM tras ser lavadas dos veces con este mismo medio sin HEPES. El flujo de autofagia fue bloqueado usando el inhibidor de autofagia baflomicina A1 (Calbiochem, 20 nM) o con la combinación de inhibidores de proteasas pepstatina A y E-64d (Sigma-Aldrich, 10  $\mu$ M cada uno). En ambos casos, baflomicina A1 o los inhibidores de proteasas fueron añadidos conjuntamente con los tratamientos.

### 3.3. Tratamientos con fármacos.

Los tratamientos con cloroquina (Sigma) a 100  $\mu$ M, los de interferón gamma (Novus Bionova) a 100 ng/ml, con 3-metiladenina (3MA, Calbiochem) a 50  $\mu$ M, con cloruro de cobalto ( $\text{CoCl}_2$ , Sigma) a 200  $\mu$ M. Los de Factor de Necrosis Tumoral ( $\text{TNF-}\alpha$ , Prepotech) a 10 ng/ml fueron, en ocasiones, realizados junto al tratamiento con cicloheximida (Sigma-Aldrich) 10  $\mu$ M para inducir muerte celular.

Ciclosporina A (CsA, Calbiochem), ABT-737 (Selleck Chemicals), necrostatina-1 (Enzo Life Sciences), FK 506 (Nucliber), ferrostatina-1 (Calbiochem) y staurosporina (STS, Santa Cruz Biotechnologies) fueron utilizadas a diferentes concentraciones entre 1- 10  $\mu$ g/ml; 1 -30  $\mu$ M; 10- 100  $\mu$ M; 1- 20  $\mu$ M; 10 nM - 1  $\mu$ M y 0,1 y 5  $\mu$ M, respectivamente. Los cotratamientos con inhibidores de caspasas fueron realizados a 50  $\mu$ M en el caso de Z-VAD (apeXbio) y 20  $\mu$ M en el de Q-VD (apeXbio)

### 3.4. Inducción de hipoxia.

Para realizar los experimentos en los que inducimos hipoxia para simular condiciones de isquemia, hemos utilizado el equipo Whitley H35 Hypoxystation (Nirco). Los medios utilizados para realizar el tratamiento de hipoxia se introdujeron en la cámara de hipoxia 1 hora antes y se burbujearon con una pipeta Pasteur para conseguir que todo el oxígeno que contenían fuese eliminado.

Pasado este tiempo, se introdujeron las placas con las células a tratar y se les cambió el medio por el del tratamiento, ya fuese ICSF (tampón de hipoxia) o medio de cultivo.

Pasado el tiempo del tratamiento, se volvió a cambiar el medio por una mezcla 1:1 de medio de cultivo condicionado (el propio que tenían las células antes de que se trataran) y medio de cultivo nuevo, y se sacaron de la cámara para comenzar la fase de recuperación en una atmósfera en condiciones normales (normoxia).

## 4. Viabilidad celular.

### 4.1. Test de viabilidad celular.

Para medir la viabilidad celular, utilizamos el kit MultiTox-Fluor Multiplex Cytotoxicity Assay (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los experimentos en los que se ha utilizado este kit fueron realizados con las neuronas sembradas en placas de 96 pocillos. Para la superficie de estos pocillos, utilizamos un volumen final de 100  $\mu$ l compuesto por 50  $\mu$ l de solución multitox y otros 50  $\mu$ l de medio condicionado (con las células incluidas). La solución multitox se preparó mediante la mezcla de 1  $\mu$ l de GF-AFC (sustrato) en 10 ml de Assay Buffer.

Una vez añadidos los 50  $\mu$ l de medio multitox a los 50  $\mu$ l de cultivo celular, dejamos incubar 30 minutos a 37° C. Pasado este tiempo, se leyó en el espectrofotómetro a 390ex/510em.

#### 4.2. Cristal Violeta.

Para realizar la técnica de tinción por cristal violeta, las células, tras ser tratadas durante el tiempo correspondiente, fueron cubiertas con la solución cristal violeta durante 20 minutos a temperatura ambiente. Después, fueron lavadas dos veces con PBS y una con agua. Se dejaron secar las placas y se resuspendió el cristal violeta adherido a ellas en solución de dodecil sulfato sódico (SDS, del inglés *Sodium Dodecyl Sulfate*) al 10%. A continuación, se midió la absorbancia a 595 nm en el equipo *BioTek's PowerWave XS microplate spectrophotometer*.

#### 4.3. Medida de muerte total.

La medida de muerte celular ha sido realizada utilizando dos técnicas diferentes: incorporación de yoduro de propidio por citometría de flujo y utilizando el kit *Cytotox96 Non Radioactive Cytotoxicity Assay* (LDH, Promega).

Para realizar la citometría se recogió el medio, se lavó dos veces con PBS (Biowest) y se tripsinizaron las células. Una vez despegadas, se mezclaron con el medio ya recogido y se centrifugó todo a 4 °C, 450 rcf durante 8 minutos. El pellet se lavó con PBS y se volvió a centrifugar para eliminar fragmentos y restos celulares. Al pellet se le añadieron 300 µl de PBS con yoduro de propidio, a una concentración de 1 mg/ml. Esta solución se incubó durante 5 minutos y se analizaron las células utilizando el citómetro *Gallios Flow Cytometer Beckman Coulter*. La cuantificación de muerte celular se realizó mediante el software FlowJo versión 7.6.4.

Además de ver que las células son positivas para yoduro de propidio, realizamos un análisis del tamaño, es decir FSC (dispersión frontal) y complejidad de la superficie celular (dispersión lateral) para confirmar la distinción entre la población de células vivas y la de muertas.

La medida de muerte utilizando el kit de LDH es una forma rápida y sencilla de hacer diferentes medidas en paralelo. En nuestro caso, hicimos uso del kit para los experimentos con neuronas primarias. La técnica fue realizada siguiendo las indicaciones del fabricante. De forma resumida, se tomaron 50 µl del medio condicionado al cual se le añadieron otros 50 µl del reactivo sustrato y se incubó 30

minutos a 37 °C. Pasado este tiempo se añadieron 50 µl de la solución de *Stop* y se midió la absorbancia a 490 nm.

#### 4.4. Western Blot.

Para realizar el western blot se recogió el medio y tras lavar dos veces con PBS la placa, se le añadió el tampón de lisis con SDS (Tabla 1) o RIPA (Thermo Scientific), previamente completados con inhibidores de fosfatasa (PhosSTOP, Roche) e inhibidores de proteasas (Roche). La cantidad de tampón (de SDS o RIPA) completo utilizado para extraer las proteínas fue variable dependiendo de la cantidad de células por condición. Para asegurar la completa rotura celular, se utilizó un raspador o *scraper*. Durante este proceso, el medio recogido fue centrifugado 430 x g durante 7 minutos para sedimentar las células. Este sedimento fue resuspendido con la muestra correspondiente ya disgregada en el tampón de lisis.

A continuación, las muestras llevadas siempre en hielo, se sonicaron para reducir la cantidad de ADN y ARN.

Para la precipitación proteica de medios condicionados mediante el uso del ácido tricloroacético (TCA, del inglés *TriChloroacetic Acid*, Merck), se añadió la solución de TCA a 8 ml de dicho medio de cada condición, hasta alcanzar una concentración final del 13%. A continuación, la mezcla se agitó vigorosamente hasta convertirse en una mezcla homogénea. Se centrifugó a 16.000 x g 15 minutos a 4 °C. El sobrenadante fue descartado y el precipitado fue resuspendido en tampón RIPA.

Las muestras fueron posteriormente cuantificadas utilizando el kit de BCA (Cultek) y siguiendo las indicaciones del fabricante. Para ello, se realizaron diluciones seriadas de albúmina bovina de concentración conocida a modo de recta patrón y se añadieron las muestras a cuantificar. Tras añadir los dos reactivos del kit en sus correspondientes proporciones, la muestra se incubó a 37 °C durante 30 minutos protegida de la luz. Pasado este tiempo, se midió la absorbancia a 595 nm. Para correlacionar los valores de absorbancia con los de concentración de proteína, se realizó una recta patrón con los valores de albúmina y se generó la ecuación que la formaba. Sustituyendo los valores de absorbancia de las muestras en la ecuación, obtuvimos la concentración de proteína de nuestras muestras.

Entre 30 y 60 µg de proteína fueron diluidos en 10 µl del tampón Laemmli 4X (Tabla 1) al que le añadimos 2-mercaptoetanol fresco (máximo dos semanas desde que se le añade). Por último, a la mezcla se le añadió PBS hasta completar el volumen final de 40 µl. Se hirvieron las muestras a 96 °C durante 10 minutos, se cargaron en el gel de poliacrilamida (de porcentaje acorde con el peso molecular de las proteínas a testear) y se corrió la electroforesis en una cubeta *Mini-protean* (Bio-Rad) con 500 ml de tampón de electroforesis (Tabla 1). A continuación, los geles se transfirieron a membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF, Millipore) o nitrocelulosa (Bio-Rad) mediante la técnica de transferencia húmeda (14 horas, 26 V a 4 °C) o transferencia semi-seca (1 hora a 200 mA por cada membrana, a temperatura ambiente), con el sistema *Trans-Blot SD* (Bio-Rad). En ambos casos, se utilizaron los tampones recomendados por el fabricante (Tabla 1).

Las membranas fueron teñidas con la solución de ponceau (Tabla 1) para verificar que la transferencia hubo funcionado correctamente. Se bloquearon las membranas con leche desnatada en polvo al 5% en tampón TTBS (del inglés *Tween Tris-Buffered Saline*, Tabla 1). Después, se incubaron con el anticuerpo primario (Tabla 2) diluido en solución de bloqueo durante 1-2 horas a temperatura ambiente o toda la noche a 4 °C, en agitación suave. A continuación, se realizaron tres lavados de 5 minutos con TTBS. Posteriormente, la membrana fue incubada con el anticuerpo secundario (Tabla 3) conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) (dilución 1/5.000) o con fluoróforos que absorben a 700 o 800 nm (dilución 1/15.000) preparados en solución de bloqueo, durante 1 hora a temperatura ambiente, en agitación suave. Se realizaron 3 lavados de 10 minutos con TTBS. Dependiendo del secundario utilizado, se reveló mediante quimioluminiscencia con el reactivo ECL (Promega) o simplemente utilizando el equipo *Odyssey Infrared Imaging System*.

Las cuantificaciones de las bandas fueron realizadas utilizando el programa *Fiji/Image J 1.47b*. La intensidad de las diferentes bandas fue ponderada frente a la intensidad de la banda de actina o ponceau (dependiendo del caso) de la misma muestra.



### 5. Inmunoprecipitación.

Las células se lisaron con el tampón de inmunoprecipitación (Tabla 1) completado con inhibidores de proteasas y utilizando un *scraper*. Se dejaron 20 minutos en hielo antes de cuantificar la proteína. Se lavaron 30 µl de bolas magnéticas (Millipore) tres veces con el tampón correspondiente sin completar y luego se bloquearon con 1 ml del tampón completado con un 5% de BSA (del inglés *Bovine Serum Albumin*, Sigma), durante 1 hora a 4 °C en agitación. Pasado este tiempo, se incubaron con 1 µg de anticuerpo durante al menos 4 horas en agitación. 1.400 µg del extracto total fueron incubados durante toda la noche (14 horas aproximadamente) con las bolas magnéticas unidas al anticuerpo. Al día siguiente, las bolas fueron lavadas cinco veces con el tampón y eluidas con 30 µl del mismo tampón, suplementado con SDS al 2%, y 10 µl de laemmli. Se hirvieron 10 minutos a 96 °C y se realizó una electroforesis de poliacrilamida.

### 6. Inmunocitoquímica.

Las células fueron sembradas sobre cristales en placas de 12 pocillos. Pasadas 24 horas, las células fueron tratadas de acuerdo con el experimento. En el caso del uso de MitoTracker red (Gibco, 200 nM diluido en DMEM-PSQ con FBS al 5%), las células fueron incubadas con el marcador 15-20 minutos antes de ser fijadas. Las células se fijaron usando paraformaldehído al 4% durante 20 minutos en agitación, e incubadas en solución de bloqueo (Tabla 1) una hora. Se incubaron después toda la noche con el anticuerpo primario (Tabla 2, dilución 1:200 en solución de bloqueo) a 4 °C.

Posteriormente, se lavaron tres veces con solución de bloqueo y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación, con un anticuerpo secundario (Tabla 3, diluido 1:400 en solución de bloqueo). A continuación, se incubaron con DAPI (Invitrogen, 1:10.000) 10 minutos en agitación y temperatura ambiente. Por último, se realizaron tres lavados más con la solución de bloqueo.

Las células se montaron en los portaobjetos con medio de montaje Vectashield (Vector laboratories). Las imágenes se tomaron utilizando el microscopio *Olympus*

*BX-60* y el microscopio confocal *Leica TSC SP5 Spectral* con un objetivo *HCX PL APO lambda blue 63X 1,4*.

La adquisición de las fotos se realizó mediante el uso del software *LEICA application Suite Advanced Fluorescence* (LAS AF) versión 2.6.0.7266 y el análisis de las fotos se hizo utilizando el *software* Fiji/Image J.

## **7. Transfecciones.**

### **7.1. Transformación de bacterias y purificación de ADN plasmídico.**

La transformación de células competentes se realizó por choque térmico para introducir el ADN plasmídico en células procariotas. El protocolo consiste en mezclar unos 10 ng de ADN plasmídico con 50 µl de bacterias competentes *Escherichia coli* HB101 (Sigma) e incubar la mezcla durante 30 minutos en hielo. A continuación, se realiza un choque térmico a 42 °C durante 30 segundos y se enfría inmediatamente en hielo durante 2 minutos. Después, se añaden 450 µl de Luria Broth Base (LB, Life Technologies) sin antibiótico y se deja a 37 °C durante 1 hora en agitación (250 rpm). A continuación, se siembran unos 100 µl aproximadamente de este cultivo en placas de LB con el antibiótico adecuado, según el plásmido utilizado. Los antibióticos se preparan según las indicaciones de la casa comercial:

-Ampilicina, (Sigma) se prepara un stock de 100 mg/ml (1.000X) en agua bidestilada, o 50 mg/ml stock (500X).

-Kanamicina (Sigma) se prepara un stock de 50 mg/ml (1.000X) en agua bidestilada.

Al día siguiente, se aísla una colonia y se introduce en 2 ml de LB con el antibiótico apropiado. Se deja en agitación a 37 °C durante toda la noche, hasta llegar al crecimiento exponencial de las bacterias. Se reserva una alícuota de bacterias transformadas a una concentración final de glicerol del 20% y se almacena a -80 °C con el fin de conservar el cultivo preparado y hacerlo crecer cuando sea necesario.

Para la extracción y purificación del plásmido, se realiza un cultivo de 100 ml de LB con el antibiótico determinado. Se inoculan 100 µl del cultivo anterior y se dejan

crecer a 37 °C durante toda la noche, a 250 rpm. Al día siguiente, se realiza la extracción de ADN con PureLink™ HiPure Plasmid DNA Purification Kit (Gibco) siguiendo las instrucciones del fabricante.

### 7.2. Transfección de plásmidos.

Todos los plásmidos utilizados están recogidos en la tabla 5. El ADN complementario de ApoL2 (NM\_030882.2) fue clonado a partir de la secuencia de Origene, en un plásmido pcDNA3.1 con resistencia a ampicilina, usando las enzimas de restricción *EcoRI* y *BamHI*. Después de la ligación, bacterias competentes *Escherichia coli* HB101 (Promega) fueron transformadas con la construcción.

Todas las transfecciones fueron realizadas siguiendo los protocolos recomendados por las casas comerciales de los diferentes agentes transfectantes.

Para los experimentos de medida de muerte en células HeLa, estas fueron transfectadas en placas de 6 pocillos usando 2 µl de Genejuice (Novagen) por µg de ADN, cuando se encontraban a una concentración de  $5 \times 10^5$  células/ml. Los experimentos de cotransfección con diferentes plásmidos se realizaron introduciendo, en todas las condiciones, el plásmido pAAV-EGFP como control positivo de la transfección. Además de este plásmido, se introdujeron los plásmidos problema en dos cantidades diferentes: 0,5 ó 0,8 µg. Por último, y para igualar la cantidad de plásmido transfectada a 2 µg en todas las condiciones, se añadió el plásmido vacío pcDNA3.1.

Dado que el factor limitante es el agente transfectante, una vez que conseguimos transfectar una célula, asumimos que ésta está transfectada por todos los plásmidos que se encuentran en el medio. De esta forma, cuando apreciamos que una célula expresa la proteína GFP, podemos considerar que esta contiene también los demás plásmidos con los que ha sido transfectada.

Para los experimentos de inmunoprecipitación en células sobreexpresando diferentes proteínas, tanto HEK293T como HeLa fueron transfectadas utilizando 3 µg de polietilenimina linear (PEI) por µg de ADN a transfectar. Ambos tipos celulares se transfectaron en placas de 100 mm de diámetro y con 20 µg de ADN total, de los

cuales 10 µg eran de pcDNA3.1 ApoL2 y los otros 10 µg eran de pcDNA3.1 HA-Bcl-2 o pcDNA3.1 HA Bcl-xL.

La transfección de neuronas primarias corticales de embrión de ratón se realizó mediante precipitación con fosfato cálcico. Para realizarla, se preparó una mezcla de 150 µl 0,25M de CaCl<sub>2</sub> que contenía 30 µg del ADN plasmídico. Esta solución se añadió gota a gota y agitando a un tubo que contenía 150 µl de tampón HeBS (Tabla 1). Se dejó la combinación de ADN-HeBS durante 30 minutos y después se añadieron 30 µl de esta a las células. Antes de añadirle a las células la mezcla de ADN-HeBS, se les cambió el medio por MEM sin glutamina (Gibco). Se dejaron incubando a 37 °C durante 4-6 horas, pasadas las cuales se miró al microscopio para cerciorarse de que se habían formado los cristales y se retiró el medio, se lavó tres veces con tampón HBSS (Gibco) y se devolvió el medio condicionado a las neuronas.

### **7.3. Transfección con siRNA.**

Todas las secuencias utilizadas para el desarrollo de esta tesis se encuentran recogidas en la tabla 4. Las células fueron transfectadas cuando estaban a 300.000 células/ml aproximadamente, con 1,5 µl del agente transfectante DharmaFECT1 (Fisher) por mililitro de volumen total. La concentración de ARN utilizada fue de 100 nM. El medio de transfección fue sustituido pasadas 24 horas por medio normal o por el tratamiento si corresponde.

## **8. Estadística.**

Todos los experimentos fueron analizados y representados utilizando la media de todas las repeticiones (el número varía dependiendo del experimento) y el error estándar de la media (S.E.M.) representado por las barras de error. Todos los datos fueron estadísticamente analizados para conocer la existencia de diferencias significativas usando el estadístico t-Student pareada de dos colas. Las diferencias significativas fueron representadas con asteriscos. \* significa  $p < 0,05$ ; \*\* significa  $p < 0,01$  y \*\*\* significa  $p < 0,001$ .

## 9. Tablas.

Solución / Tampón	Composición
<b>EBSS</b>	1,8 mM CaCl <sub>2</sub> ; 0,813 mM MgSO <sub>4</sub> ; 5,33 mM KCl; 26,19 mM NaHCO <sub>3</sub> ; 117,24 mM NaCl; 1,01mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 5,56 mM D-glucosa; en agua miliQ.
<b>Electroforesis (10x)</b>	0,24 M tris-HCl; 1,92 M glicina; 34,67mM SDS; en agua miliQ; pH 8,3.
<b>HeBS</b>	50 mM BES (Bis-2 hidroxietil-2-aminoetanosulfónico); 1,5 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 280 mM NaCl; en agua miliQ.
<b>ICSF</b>	70 mM NaCl; 70 mM KCl; 2 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 2 mM MgSO <sub>4</sub> ; 0,3 mM CaCl <sub>2</sub> ; 10 mM sacarosa; 6 mM NaHCO <sub>3</sub> ; pH 6,8.
<b>Inmunoprecipitación</b>	20 mM tris-HCl (pH 7,5), 137 mM NaCl, 1% tritón X-100, 2 mM EDTA; en agua miliQ; pH 8.
<b>Laemmli (4X)</b>	63 mM tris-HCl; 10% glicerol; 2% SDS; 0,01% azul de bromofenol; 5% 2-mercaptoetanol; en agua miliQ.
<b>Medio de cultivo (neuronas)</b>	Medio neurobasal; 10% PSQ; 2% B27.
<b>Medio de siembra (neuronas)</b>	445 ml MEM sin glutamina; 5% FBS; 5% suero de caballo; 10% PSQ; 33,30mM D-Glucosa.
<b>Solución bloqueo inmunocitoquímica</b>	0.05% Tritón, 3% BSA en PBS.
<b>Tampón de disección</b>	2 tabletas de PBS; 3138mM BSA; 13,9mM D-glucosa; en agua miliQ.
<b>Tampón de lisis</b>	60 mM tris-HCl; 2% SDS; en agua miliQ.
<b>TBS (10x)</b>	0,1 M tris-HCl; 1,5 M NaCl; en agua miliQ; pH 7,5.
<b>Tinción de ponceau</b>	1,31 mM Ponceau; 5% ácido acético; en agua miliQ.
<b>Transferencia húmeda</b>	25 mM tris-HCl; 0,2 M glicina; 3,46 mM SDS; 20% metanol; en agua miliQ.
<b>Transferencia semi-seca</b>	48 mM tris-HCl; 39 mM glicina; 0,035% SDS; 20% metanol; en agua miliQ.
<b>TTBS</b>	0,1% tween en TBS 1X.

**Tabla 1. Tampones y soluciones utilizadas para el desarrollo de los experimentos.** La tabla muestra la composición detallada de todas las soluciones y tampones que se han realizado en el laboratorio para el correcto desarrollo de los experimentos.

Proteína	Mono / Policlonal	Especie Purificación	Casa comercial, Clon	Técnica utilizada
<b>4EBP1</b>	Policlonal	Ratón	Cell Sig.	WB
<b>ACC</b>	Monoclonal	Conejo	Cell Sig., C83B10	WB
<b>ACC (fosforilada)</b>	Policlonal	Conejo	Cell Sig.	WB
<b>Actina</b>	Monoclonal	Ratón	ICN, clone C4	WB
<b>AMPK (fosforilada)</b>	Monoclonal	Conejo	Cell Sig., 40H9	WB
<b>AMPK 1/2</b>	Monoclonal	Ratón	Santa Cruz, D-6	WB
<b>ApoL2</b>	Policlonal	Conejo	Sigma	WB/IP/IC
<b>ATF4/CREB2</b>	Policlonal	Conejo	Santa Cruz	WB
<b>ATG5</b>	Policlonal	Conejo	CosmoBio	WB
<b>Bcl-2</b>	Monoclonal	Ratón	Santa Cruz, 100	WB
<b>Bcl-xL</b>	Monoclonal	Conejo	Cell Sig., 54H6	WB
<b>Beclina</b>	Monoclonal	Ratón	BD, 20/Beclin	WB
<b>CAIX</b>	Monoclonal	Conejo	AbcamAb15086	WB
<b>Calnexina</b>	Monoclonal	Ratón	Santa Cruz, E-10	IC
<b>Caspasa 3</b>	Policlonal	Conejo	Cell Sig.	WB
<b>GRP94</b>	Policlonal	Cabra	Santa Cruz, C-19	IC
<b>HA</b>	Monoclonal	Ratón	Sigma, HA-7	WB/IP
<b>Lamp-2</b>	Monoclonal	Ratón	BD, Pharmingen CD107b	IC
<b>LC3</b>	Policlonal	Conejo	Abcam	WB
<b>Mcl-1</b>	Policlonal	Conejo	Santa Cruz	WB
<b>Noxa</b>	Policlonal	Conejo	Abcam	WB
<b>p62</b>	Policlonal	Cobaya	Progen	WB
<b>PARP</b>	Policlonal	Conejo	Cell Sig.	WB
<b>S6</b>	Policlonal	Conejo	Upstate	WB
<b>S6 (fosforilada)</b>	Policlonal	Conejo	Cell Sig.	WB
<b>Tubulina <math>\beta</math></b>	Monoclonal	Ratón	Sigma, T4026	WB

**Tabla 2. Relación de anticuerpos primarios utilizados. La tabla muestra las características concretas de cada anticuerpo primario utilizado.** Por orden, la tabla refleja: la proteína que es detectada (y si es en su forma fosforilada), el tipo de anticuerpo (monoclonal o policlonal), el animal en el que ha sido producido, la casa comercial y el clon (en el caso en el que sea monoclonal) y las técnicas en las que ha sido utilizado. IP significa inmunoprecipitación; IC, Inmunocitoquímica y WB western blot.

Frente	Conjugado con	Casa comercial	Técnica utilizada
Cabra	HRP	Rocklad	WB
Cabra	Alexa 568	Alexa	IC
Conejo	HRP	Zymax 81-6120	WB
Conejo	IRDye 800CW	LI-COR Biosciences	WB
Conejo	Alexa 568	Alexa	IC
Conejo	Alexa 488	Alexa	IC
Ratón	HRP	Zymax	WB
Ratón	IRDye 680CW	LI-COR Biosciences	WB
Ratón	Alexa 488	Alexa	IC

**Tabla 3. Relación de anticuerpos secundarios utilizados.** La tabla muestra las características concretas de cada anticuerpo secundario utilizado. Por orden, la tabla refleja: la especie animal que detecta, el conjugado que presenta, la casa comercial y las técnicas en las que ha sido utilizado; IC significa Inmunocitoquímica y WB, western blot.

Nombre	Diana	Secuencia
ApoL2-I	ApoL2	GCGGCACCAAUGUAGCAAA[dT][dT]
ApoL2-II	ApoL2	CAGUGUGGUAGAACUAGUA[dT][dT]
ApoL2-III	ApoL2	CAAUGUUCUUACCUUAGUU[dT][dT]
Control 1	-	5'-GUAAGACACGACUUAUCGC[dT][dT]
Control 2	RIPK de ratón	ON-TARGET mezcla de 4 secuencias RIPK de ratón. (Dharmacon)

**Tabla 4. Relación de secuencias siRNA utilizadas.** La tabla muestra secuencias siRNA concretas utilizadas para silenciar proteínas así como los controles.

Inserto	Vector	Modelo	Método de transfección
-	pcDNA3.1	HeLa, Neuronas	HeLa: GeneJuice. NPCER: Precipitación con fosfato cálcico
<b>ApoL2</b>	pcDNA3.1	HeLa	PEI y GeneJuice
<b>Bcl-2</b>	pcDNA3.1	HeLa,	GeneJuice.
<b>Bmf</b>	pcDNA3.1	HeLa	GeneJuice
<b>GFP</b>	pAAV	HeLa	GeneJuice
<b>HA-Bcl-2</b>	pcDNA3.1	HeLa	PEI
<b>HA-Noxa</b>	pcDNA3.1	HeLa	GeneJuice
<b>Histona 2B-GFP</b>	pcDNA3.1	Neuronas	Precipitación con fosfato cálcico
<b>scramble</b>	pFIV_H1U6	Neuronas	Precipitación con fosfato cálcico
<b>siNoxa</b>	pFIV_H1U6	Neuronas	Precipitación con fosfato cálcico

**Tabla 5. Relación de plásmidos utilizados. La tabla muestra las características concretas de cada uno de los plásmidos utilizados.** Por orden, la tabla refleja: el inserto que contiene el plásmido, el vector en el que se ha realizado la construcción, en qué células ha sido utilizado y el método empleado para su uso blot.

Producto	Casa Comercial	Referencia
<b>3Metiladenina</b>	Calbiochem	189490
<b>ABT-737</b>	Selleck Chemicals	S1002
<b>Ampicilina</b>	Sigma	A9518
<b>Azul de tripán</b>	Sigma	93595
<b>B27</b>	Gibco	17504-044
<b>BCA kit</b>	Cultek	23225
<b>Bolas magnéticas</b>	Millipore	LSKMAGG02
<b>BSA</b>	Sigma	A7030
<b>Cicloheximida</b>	Sigma	C7698-1G
<b>Ciclosporina A</b>	Calbiochem	239835-100MG
<b>Cloroquina</b>	Sigma	C6628
<b>DAPI</b>	Invitrogen	MP01306
<b>D-glucosa</b>	Sigma	G7021
<b>DharmaFECT1</b>	Fisher	W9945D
<b>DMEM</b>	Gibco	41965-062
<b>DMEM (sin glucosa)</b>	Gibco	11966-025

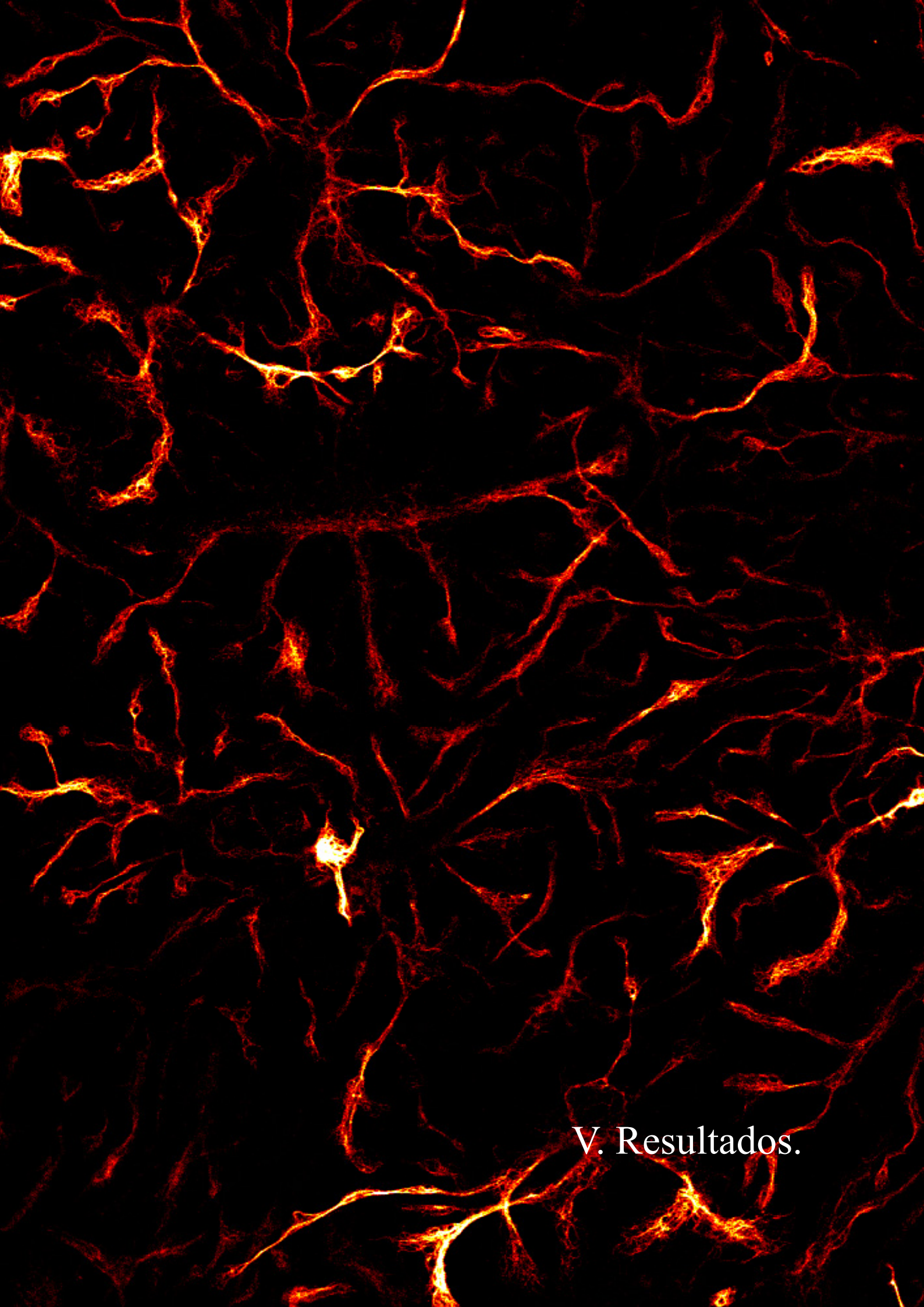


Producto	Casa Comercial	Referencia
D-glucosa	Sigma	G7021
DharmaFECT1	Fisher	W9945D
DMEM	Gibco	41965-062
DMEM (sin glucosa)	Gibco	11966-025
DMSO	Sigma	D2650
DNase A	Qiagen	79254
ECL kit	Promega	W1001
Escherichia coli competentes HB101	Promega	L2011
Factor de Necrosis Tumoral alfa ( $\alpha$ -TNF)	Prepotech	300-01A
Ferostatina-1	Calbiochem	341494-25MG
FK 506	Nucliber	TLRL-FK5
Glutamina	Gibco	25030-024
HBSS	Gibco	24020-091
Interferón gamma ( $\gamma$ -IFN)	Novus Bionova	NBC1-21340
Ioduro de propidio	Sigma	81845
Kanamicina	Sigma	B5264
Kit PureLink™ HiPure Plasmid DNA Purification	Invitrogen	K2100-04
Medio de cultivo Luria Bertani (LB)	Gibco	12795-027
Membrana nitrocelulosa (Wb)	Bio-Rad	162-0112
Membrana PVDF (Wb)	Merck Millipore	IPFL00010
MultiTox-Fluor Multiplex Cytotoxicity Assay	Promega	G9200
Neurobasal	Gibco	21103-049
PBS 10X	Biowest	X0515-500
Penicilina-Estreptomicina	Gibco	15140-122
PhosphoSTOP	Roche	4906845001
Placas 100 mm	Falcon, Corning	353003
Polietilenimina linear (PEI)	Polyscience Europe	23966
Q-VD	apeXbio	A1901
RIPA	Thermo scientific	89900
Staurosporina	Calbiochem	Calbiochem
Suero Bovino Fetal (FBS)	Gibco	108603
Triton X-100	VWR	108603
Z-VAD	apeXbio	A1902

**Tabla 6 (continuación). Relación de reactivos comerciales utilizados.** La tabla muestra las características concretas de los reactivos comerciales utilizados. Por orden, la tabla refleja: nombre del producto, casa comercial y la referencia.







V. Resultados.



## 1. Generación de HMM y búsqueda de BH3-only.

Históricamente, las proteínas BH3-only han sido descritas más por su función que por su estructura. Esto es debido principalmente a que las proteínas de esta subclase no tienen una homología muy alta entre ellas. Ni siquiera en cuanto a lo que al dominio BH3 respecta, ya que una peculiaridad del mismo es que sólo están conservados unos pocos residuos.

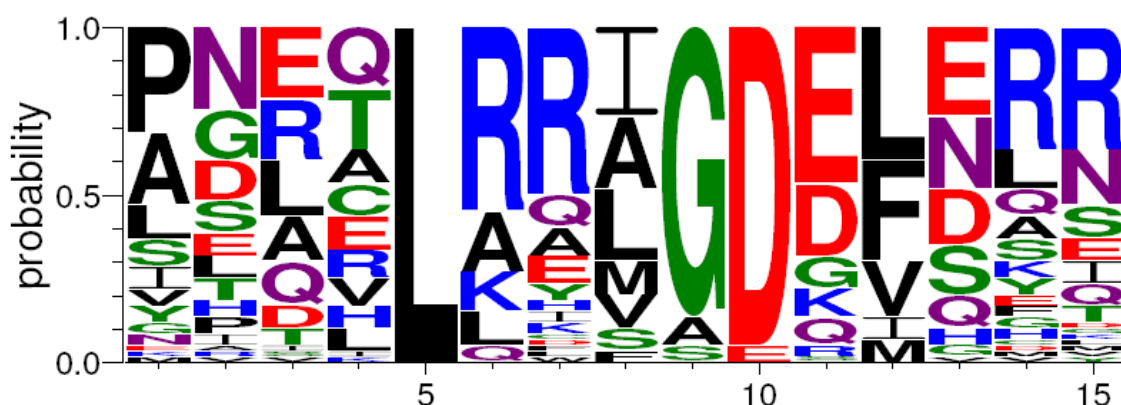
Las búsquedas en bases de datos como Prosite o Pfam basadas en perfiles como el del dominio BH3, así como las búsquedas de expresión con motivos descritos en la bibliografía, han sido infructíferas e ineficaces en cuanto a especificidad y sensibilidad a la hora de detectar proteínas que contienen el motivo BH3 (Tabla 7).

Tipo de Búsqueda	Número de BH3 encontrados	Identificadas	Sensibilidad (P/P+FN)
1. Youle et al.	5908	13	68.4%
2. Liu et al.	152	16	84.2%
3. Prosite	28	9	47.36%
4. Novel HMM	26	19	100%

**Tabla 7. Resumen de los resultados obtenidos mediante la búsqueda del motivo BH3 en el proteoma humano mediante el uso de diferentes estrategias.** La primera columna indica la estrategia de búsqueda: búsqueda directa utilizando (1) la secuencia consenso BH3 (LXXXGD) definida en (Youle and Strasser, 2008); (2) el motivo específico (LXXX[GAS][DE]) utilizado por (Liu *et al.*, 2005) en su identificación de ApoL6; (3) el motivo definido por Prosite 10 en Diciembre 2008; y (4) una búsqueda basada en el HMM con la secuencia generada mediante este trabajo. Las siguientes columnas indican respectivamente, el número total de veces que se identificó el motivo BH3 en el proteoma humano (Ensembl42), el número de miembros de la familia conocidos identificados de un total de 19 descritos en Youle et al. y Uniprot (2008), y finalmente, la sensibilidad de la búsqueda computada mediante la división del número total de miembros Bcl-2 encontrados correctamente (TP) entre el total de miembros de la familia Bcl-2 que están descritos como tal (TP+FN=19). TP significa Positivo (del inglés *True Positive*) y FN significa falso negativo.

Por todo ello, el trabajo previo en el laboratorio se centró en recolectar todas las secuencias de ratón y humano que contenían el dominio BH3 de Uniprot, así como aquellas que estaban descritas en la literatura, con el fin de identificar eficientemente posibles proteínas BH3-only. Se realizó entonces el alineamiento para poder construir un HMM (del inglés *Hidden Markov Model*) para el dominio BH3 (Figura 17). La generación del HMM sobre la secuencia de lo que podría denominarse el núcleo del dominio, fue realizada atendiendo a la probabilidad de que un residuo

concreto se encuentre en cada posición del BH3. El HMM proporcionó mejores resultados a la hora de identificar proteínas con dominio BH3 que ya eran conocidas



**Figura 17. Hidden Markov Model. Secuencia del motivo BH3 utilizada para la búsqueda de proteínas BH3-only.** El diagrama indica la probabilidad de encontrar un determinado aminoácido en cada una de las 15 posiciones del dominio BH3.

comparado con los perfiles de Pfam (Tabla 7) y, por consiguiente, se utilizó para la búsqueda de proteínas que contienen el dominio BH3 a lo largo del proteoma y genoma humano. Nuestro cribado identificó Bfk, una conocida proteína homóloga a Bcl-2 que no se tuvo en cuenta a la hora de hacer el HMM (Coultas *et al.*, 2003), así como PXT1 que recientemente ha sido descrita como una proteína capaz de matar a las células HeLa de manera dependiente a su motivo BH3 (Tabla 8).

Nombre	UniProt ID	NM ID	Nº de aminoácidos	Ensembl ID
Apolipoprotein L2 (ApoL2)	Q9BQE5	NM_030882.2 NM_145637.1	337	ENSG00000128335
Arf-GAP con alfa hélices enrolladas, repeticiones ANK y dominio PH3 (ACAP3)	Q96P50	NM_030649.2	834	ENSG00000131584
Proteína O-fucosiltransferasa 2 (POFUT2)	Q9Y2G5	NM_015227.4	429	ENSG00000186866
Fenilalanina-4-hydroxylasa (PHA)	P00439	NM_000277.1	452	ENSG00000171759
Proteína peroxisomal específica de testículo 1 (PXT1)	J3KR74	NM_152990.3	134	ENSG00000179165
Proteína no caracterizada C19orf55 (C19orf55)	Q2NL68	NM_001039887	480 (posible)	ENSG00000167595

**Tabla 8. Resumen de las posibles proteínas BH3-only predichas usando HMM.** La tabla muestra el número de aminoácidos de la proteína, así como los diferentes códigos de identificación de las principales bases de datos: Uniprot (<http://www.uniprot.org/>), NM (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y Ensembl (<http://www.ensembl.org/>).



Proteína	UniProt ID	Secuencia del motivo BH3
Bim	O43521	IAQE <b>L</b> RRIG <b>D</b> EFNAY
Bad	Q92934	YGRE <b>L</b> RRMS <b>D</b> EFVDS
Puma	Q9BXH1	IGAQ <b>L</b> RRM <b>A</b> DDLNAQ
Noxa	Q13794	CATQ <b>L</b> RRFG <b>D</b> KLNFR
Bcl-Rambo	Q9B XK5	MEDC <b>L</b> AHLG <b>E</b> KVSQE
Beclin-1	Q14457	LSRR <b>L</b> KVTG <b>D</b> LFDIM
ApoL6	Q9BWW8	NIDK <b>L</b> RAL <b>A</b> DDIDKT
ApoL1	O14791	NIRR <b>L</b> RAL <b>A</b> DGVQKV
ApoL2	Q9BQE5	HIRK <b>L</b> RAL <b>A</b> EEVEQV

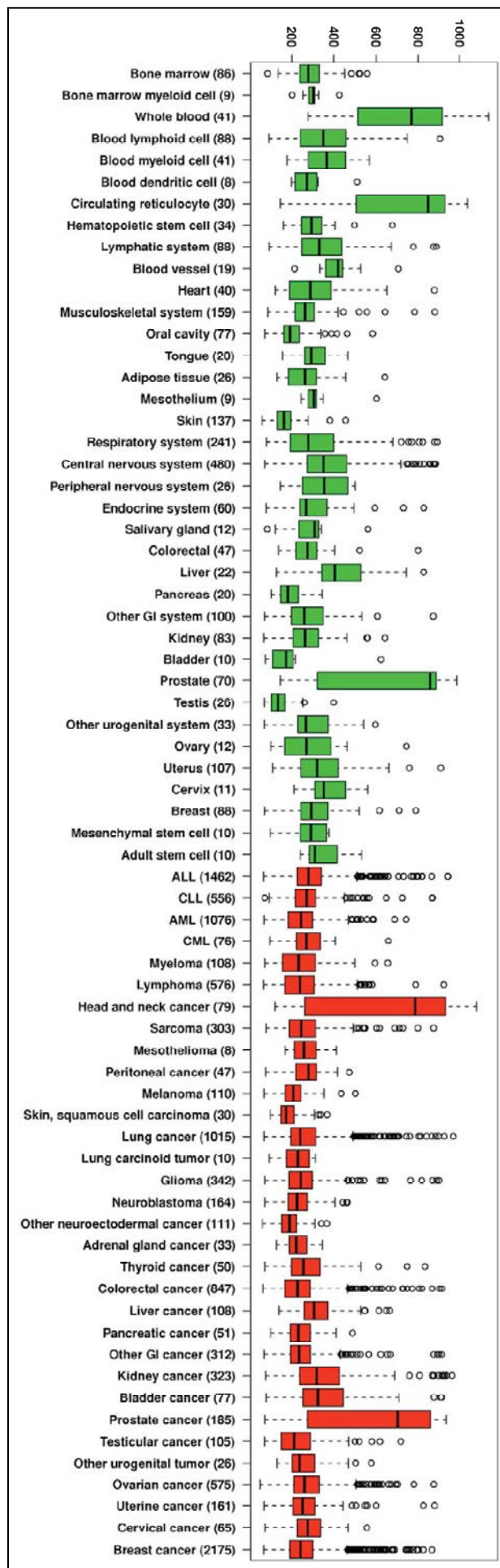
**Tabla 9. ApoL2 contiene un motivo similar al dominio BH3.** La tabla muestra el alineamiento de diferentes proteínas que contienen un dominio BH3. Resaltados en negrita encontramos los residuos que están altamente conservados según nuestros resultados.

Aparecieron también en el cribado las enzimas Fenilalanina hidroxilasa y una O-fucosiltransferasa, ambas descritas y con funciones bien esclarecidas. Una proteína de 834 residuos fue descartada por su peso molecular elevado. Por último, la proteína Apolipoproteína L2 (Tablas 8 y 9), fue la que llamó realmente la atención porque se conocía poco sobre ella, su peso molecular no era muy alto (las proteínas BH3-only no son muy grandes), y además pertenecía a la familia de las Apolipoproteínas L. Dos miembros de la familia Apolipoproteína L, ApoL1 y ApoL6, han sido anteriormente identificadas como proteínas BH3-only (Liu *et al.*, 2005; Wan *et al.*, 2008; Zhaorigetu *et al.*, 2008)

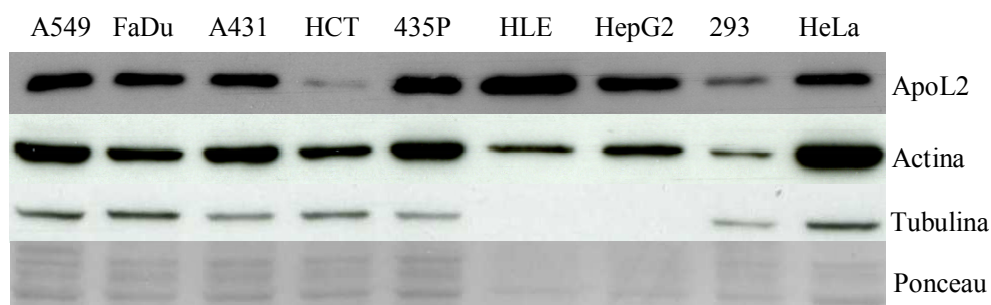
## 2. Identificación de ApoL2 como proteína BH3-only ubicua.

ApoL2, gracias a su homología con ApoL1 y ApoL6, ha sido propuesta como proteína BH3-only (Liao *et al.*, 2011). Su ARNm está expresado de forma ubicua de acuerdo con la base de datos IST Online (Figura 18). Hemos comprobado que esta proteína se expresa claramente en una gran variedad de líneas celulares procedentes de diversos orígenes (Figura 19) y está altamente expresada en la línea celular de cáncer cervical HeLa. Esta alta expresión concuerda con los datos previos que sitúan a esta proteína como inducida en cáncer cervical (Ahn *et al.*, 2004).





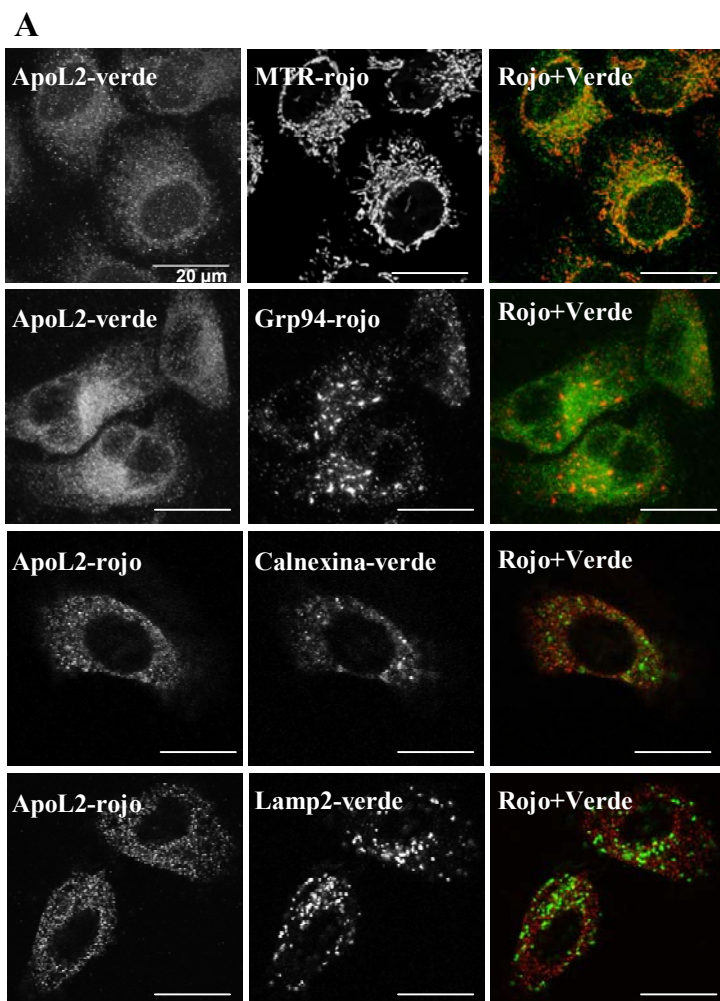
**Figura 18. Expresión de ApoL2 en tejidos sanos y tumorales.** Las barras representan tejidos sanos en verde, y tumorales en rojo. El eje de la Y representa el percentil de los datos, la línea horizontal representa la mediana. Las discontinuas se extienden a 1,5 veces el rango intercuartil de los bordes de la barra, por lo que cualquier dato fuera de ese rango es considerado valor atípico (*outlier*) y es representado con un círculo hueco. Datos obtenidos de IST Online™ ([ist.medisapiens.com](http://ist.medisapiens.com)).



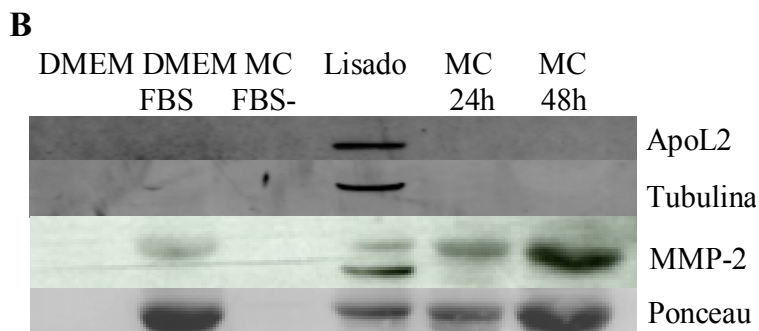
**Figura 19. La Apolipoproteína L2 está ampliamente expresada en diferentes líneas celulares humanas.** La expresión de ApoL2 fue testada mediante western blot en las siguientes líneas celulares: A549, FaDu, A-431, HCT116, 435P, HLE, HepG2, HEK293 y HeLa. Se utilizaron anticuerpos frente a ApoL2, actina y tubulina, así como la tinción de ponceau.

### 3. Localización de ApoL2 en HeLa.

La localización celular de una proteína, en ocasiones, puede resultar muy buen indicador del tipo de función (o funciones) que desarrolla. En el caso de ApoL2 como supuesta proteína BH3-only, quisimos comprobar primero el patrón de distribución dentro de la célula. Como se puede observar en la Figura 20A, ApoL2 está localizada fuera del núcleo, aunque ha sido predicho que puede interaccionar con membranas, no colocaliza con Mitotracker (marcador mitocondrial), Grp94, calnexina (marcadores de retículo endoplasmático), ni con Lamp-2 (marcador lisosomal). Podemos afirmar que ApoL2 se encuentra en el citosol, que no parece estar asociado a ningún orgánulo celular y que está distribuido de forma punteada más o menos homogéneamente en todo el volumen celular. También comprobamos que esta proteína, además de estar en el citoplasma sin formar grandes agregados, no fuese secretada por las células, ya que ApoL1 sí que contiene el péptido señal que le hace ser exportado (Figura 20B).



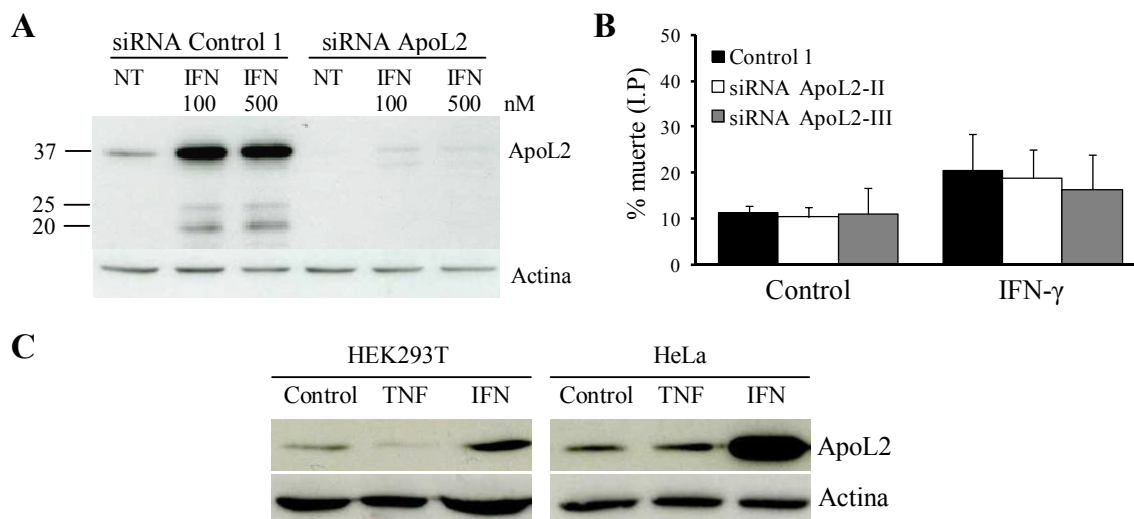
**Figura 20. La localización de ApoL2 es intracelular y citosólica.** (A) Inmunocitoquímica en HeLa utilizando MitoTracker red (MTR) como marcador mitocondrial. Los anticuerpos frente a Grp94 y calnexina se usaron como marcadores de retículo endoplasmático. Como marcador de lisosomas se empleó un anticuerpo frente a Lamp-2. Las imágenes fueron realizadas mediante microscopía confocal. La barra de escala mostrada es de 20  $\mu$ m. (B) Western blot de medio y lisado celular concentrado con ácido tricloroacético (TCA). DMEM y DMEM+FBS fueron usados como controles. MC FBS-significa medio condicionado de HeLa cultivadas en DMEM sin FBS durante 48 horas. Lisado significa que la muestra obtenida proviene de HeLa plaqueadas 48 horas antes en medio con FBS. MC hace referencia a medio con FBS condicionado durante los tiempos indicados. Se utilizaron anticuerpos frente a ApoL2, tubulina, actina y a la proteína secretada metaloproteína-2 (MMP-2) para realizar el western blot.



#### 4. ApoL2 no protege frente a la muerte inducida por IFN- $\gamma$ en HeLa.

Bien es sabido que las células epiteliales son más sensibles a las señales mediante citoquinas que otros tipos celulares. Se ha descrito que las proteínas ApoL son inducidas tanto por TNF- $\alpha$  como por IFN- $\gamma$  (Horrevoets *et al.*, 1999; Sana *et al.*, 2005). Más concretamente, ApoL2 es inducida por IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  en un buen número de tejidos no tumorales (Liao *et al.*, 2011). En células broncoepiteliales, el silenciamiento transitorio de esta proteína sensibiliza las células frente a la

citotoxicidad inducida por interferón, lo que nos indica que ApoL2 es una proteína antiapoptótica en dicho contexto (Liao *et al.*, 2011). Nosotros hemos observado que el tratamiento con IFN- $\gamma$  (Figura 21A, Figura 21C), pero no el tratamiento con TNF- $\alpha$  (Figura 21C), induce la proteína ApoL2. Esta inducción por interferón también la hemos podido detectar en células HEK293T (Figura 21C).



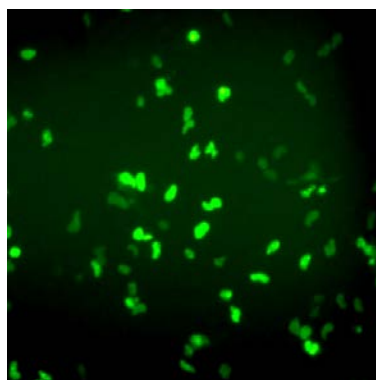
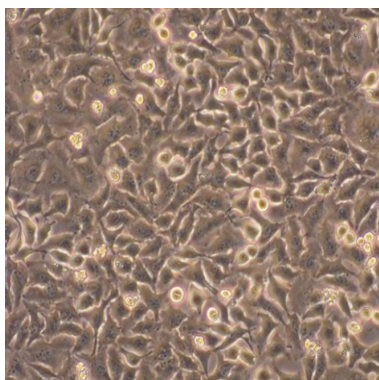
**Figura 21. ApoL2 es inducida por el tratamiento con TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  pero no interviene en su citotoxicidad.** (A) Western Blot de células HeLa transfectadas con siRNA control 1 y siRNA ApoL2-II y tratadas con IFN- $\gamma$  (IFN) durante 24 horas. NT: No tratadas. (B) Cuantificación de muerte total mediante incorporación de Ioduro de Propidio en células HeLa transfectadas con siRNA control 1, siRNA ApoL2-II y siRNA ApoL2-III y tratadas con IFN- $\gamma$  (IFN) durante 72 horas. La gráfica muestra la media y S.E.M de 3 experimentos independientes. (C) Western blot de ApoL2 en células HeLa y HEK 293T tratadas con TNF- $\alpha$  (TNF) 10 ng/ml e IFN- $\gamma$  500 ng/ml durante 24 horas.

No obstante, cuando silenciamos ApoL2 en HeLa mediante el uso de dos secuencias siRNA ApoL2 y comprobamos que el silenciamiento es prácticamente completo (Figura 21A), no observamos sensibilización de estas células frente al IFN- $\gamma$  (Figura 21B). Aunque bien es cierto que en HeLa el tratamiento con IFN- $\gamma$  sólo induce un 20% de muerte.

## 5. ApoL2 no es una proteína BH3-only.

### 5.1. La sobreexpresión de ApoL2 no induce muerte ni protege las células HeLa frente a la sobreexpresión de BH3-only.

Para comprobar si ApoL2 se comporta como una proteína proapoptótica de la familia Bcl-2, sobreexpresamos la proteína en HeLa. Realizamos una transfección solamente con el plásmido que contiene GFP (del inglés *Green Fluorescent Protein*) para comprobar que la eficiencia de transfección era significativa (Figura 22). La correcta sobreexpresión de la proteína fue confirmada mediante inmunofluorescencia (Figura 22A).

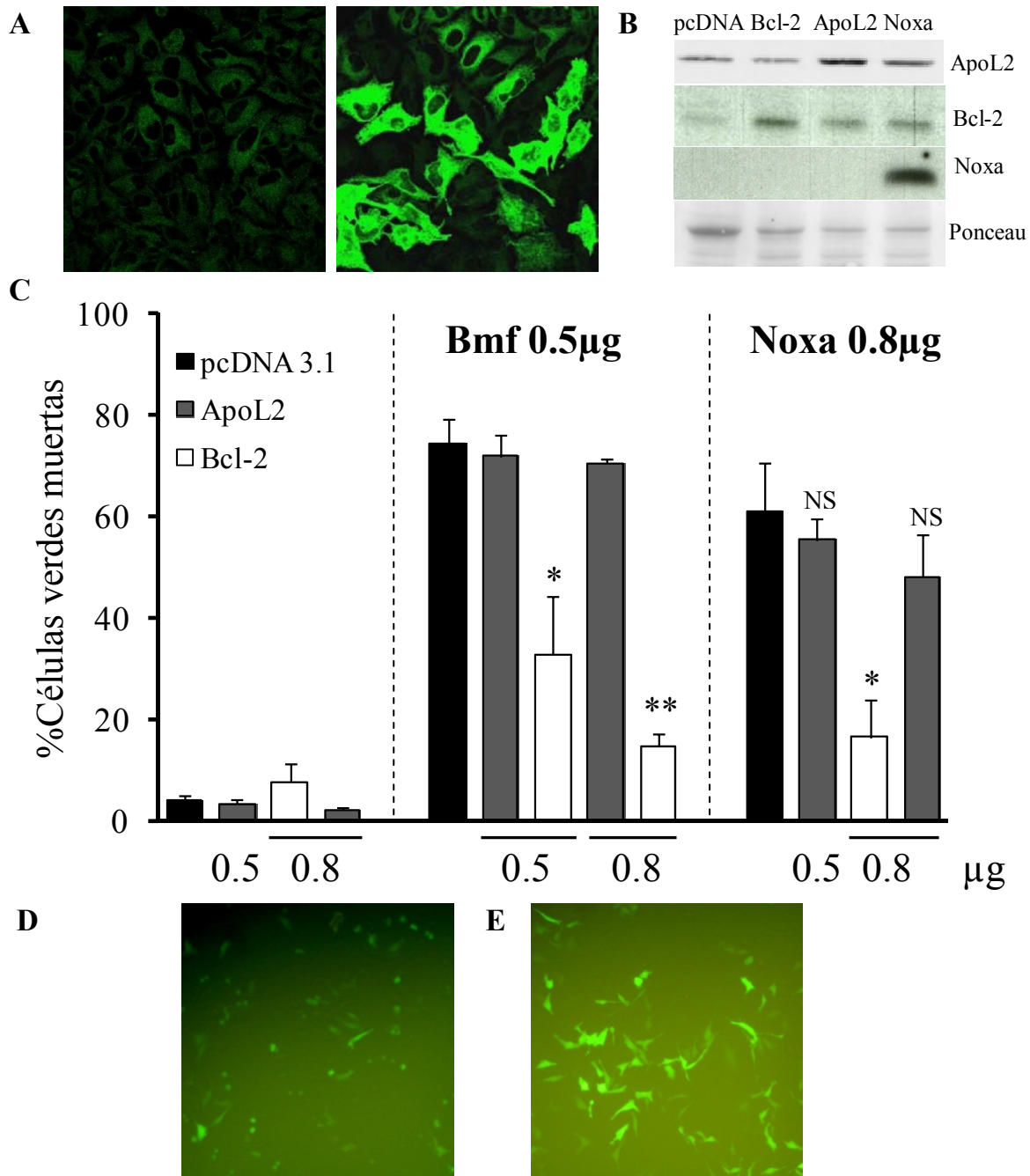


**Figura 22. Imágenes de la transfección en HeLa.** Células transfectadas con el plásmido que codifica para GFP durante 14 horas. La figura muestra una imagen en campo claro y una imagen con fluorescencia de la señal de GFP. Las fotos fueron tomadas utilizando el objetivo 20X.

Utilizamos Noxa y Bmf como proteínas BH3-only y verificamos que la sobreexpresión de estas dos proteínas fuese suficiente para inducir la muerte por apoptosis en HeLa (Figura 23C). Por el contrario, la sobreexpresión de ApoL2 no induce muerte en HeLa, sino que protege ligeramente de la muerte basal de la población. Por este motivo, y puesto que está descrito un papel antiapoptótico para esta proteína, decidimos realizar una cotransfección de ApoL2 con las proteínas BH3-only Noxa y Bmf para comprobar si ApoL2 es capaz de proteger las células frente a la muerte inducida por la sobreexpresión de estas dos proteínas. Bcl-2 fue sobreexpresada también como control de protección frente a la sobreexpresión de las proteínas BH3-only de forma efectiva, tal y como se observa en la figura 23B, C. En esta misma gráfica, se ve reflejada una ligera protección de ApoL2 frente a la sobreexpresión de Noxa, no obstante esta protección no es significativa ( $n=3$ ). La sobreexpresión de Bcl-2 y Noxa fue también confirmada por western blot (Figura 23B) mientras que la de Bmf no pudo revelarse mediante este método.

La sobreexpresión de esta proteína ocasiona que las células mueran por apoptosis de forma rápida y masiva. Podría ser que en el momento en el que hemos realizado el western blot (16 horas tras la transfección), las proteínas hayan sido liberadas al medio extracelular y así hayamos perdido la señal de Bmf. Además, los anticuerpos frente a Bmf son bastante conflictivos, tanto es así que la visualización de Bmf mediante western blot ha sido una tarea siempre pendiente en esta tesis. No obstante la sobreexpresión de la proteína queda claramente confirmada por el fenotipo de la población: muerte masiva en menos de 20 horas que puede ser prevenida con inhibidores de caspasas (Figura 23D, E).



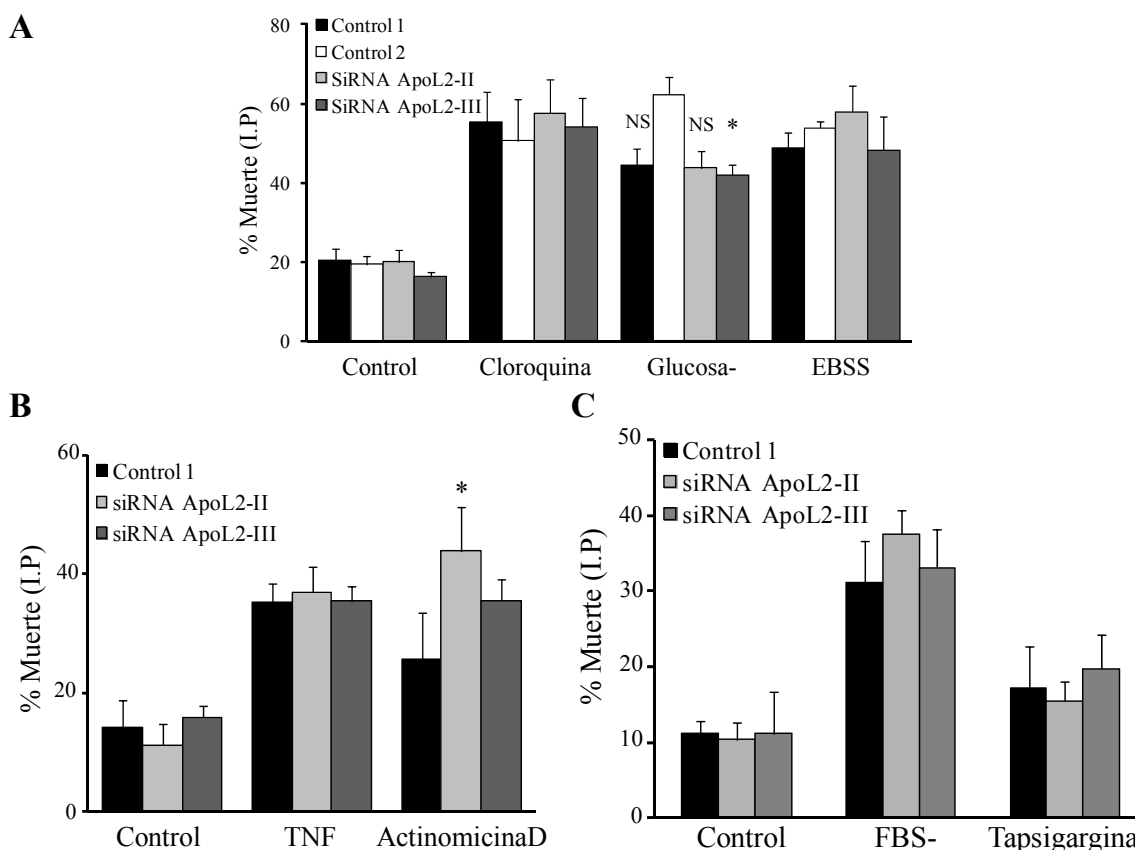


**Figura 23. La sobreexpresión de ApoL2 no mata, ni tampoco protege frente a la sobreexpresión de las proteínas BH3-only Noxa y Bmf.** (A) Inmunocitoquímica en HeLa transfectadas con el plásmido vacío pcDNA 3.1 (izquierda) y ApoL2 (derecha) e incubadas con el anticuerpo frente ApoL2. (B) Western blot en células HeLa transfectadas con 0,8 µg de los plásmidos pcDNA, Bcl-2, ApoL2 y Noxa, durante 14 horas. Se utilizaron anticuerpos frente a esas mismas proteínas así como la tinción de ponceau como control de carga. (C) Células HeLa cotransfectadas con dos plásmidos diferentes que codifican proteínas BH3-only (0,5 µg de Bmf y 0,8 µg de Noxa) y ApoL2 o Bcl-2 y analizadas al microscopio. Como marcador de transfección se utilizaron 0,3 µg del plásmido que codifica para GFP. Los plásmidos ApoL2 y Bcl-2 fueron utilizados en las cantidades expresadas en la gráfica. pcDNA 3.1 fue utilizado para normalizar la cantidad de ADN transfectado. El conteo de células verdes muertas fue realizado atendiendo a la morfología contraída, en imágenes tomadas mediante microscopía de fluorescencia. En la gráfica se muestra la media y S.E.M. de al menos 3 experimentos independientes. Para el análisis estadístico, cada condición de sobreexpresión ApoL2 o Bcl-2 junto a una BH3-only, ha sido comparada con la condición plásmido vacío pcDNA3.1 junto a la misma proteína BH3-only. NS: no significativo. Células HeLa transfectadas con el plásmido GFP y con el plásmido Bmf (D y E) y tratadas con Q-VD (E). A las 14 horas se tomaron fotos con fluorescencia con el objetivo de 20X.

## 5.2. El silenciamiento de ApoL2 no protege ni sensibiliza frente a diversos estímulos de muerte en HeLa.

Para identificar si ApoL2 tiene un rol en cuanto a la regulación apoptótica, bien sea antiapoptótico (Liao *et al.*, 2011) o bien proapoptótico (una vez activada una ruta apoptótica específica), se realizó un silenciamiento de ApoL2. Se utilizaron dos secuencias frente a esta proteína y una secuencia (Figura 24B y C) o dos (Figura 24A) como control. Tratamos las células con una amplia variedad de estímulos inductores de muerte celular que cubren buena parte de las vías de activación de apoptosis.

Tratamos las células con tapsigargina para inducir estrés reticular, actinomicina D para inducir daño en el ADN y cloroquina para bloquear la autofagia a nivel



**Figura 24: ApoL2 no interviene en la muerte inducida por diferentes estímulos apoptóticos en HeLa.** Medida de muerte total por incorporación de ioduro de propidio (I.P.) en células HeLa transfectadas con diferentes siRNA controles y siRNA frente a ApoL2 y tratadas mediante la retirada de FBS (FBS-), glucosa (Glucosa -) y de nutrientes (EBSS), y mediante el uso de cloroquina (100  $\mu$ M), tapsigargina (100  $\mu$ M), TNF- $\alpha$  (100  $\mu$ M) + cicloheximida (TNF, 10  $\mu$ M) y actinomicina D (100 $\mu$ M). Los tratamientos se llevaron a cabo durante 24 (B y C) y 72 horas (A). La muerte celular fue cuantificada por incorporación de ioduro de propidio mediante citometría de flujo. La figura muestra la media y S.E.M de 3 (A) o 5 (B y C) experimentos. La estadística fue realizada comparando los tratamientos frente a Control 1 (B y C) o Control 2 (A). NS: No significativo.



lisosomal. Para inducir respuesta frente a la falta de factores tróficos y metabolitos esenciales, sometimos a las células a la retirada de suero, de suero/aminoácidos/vitaminas (tratamiento con EBSS) y de glucosa.

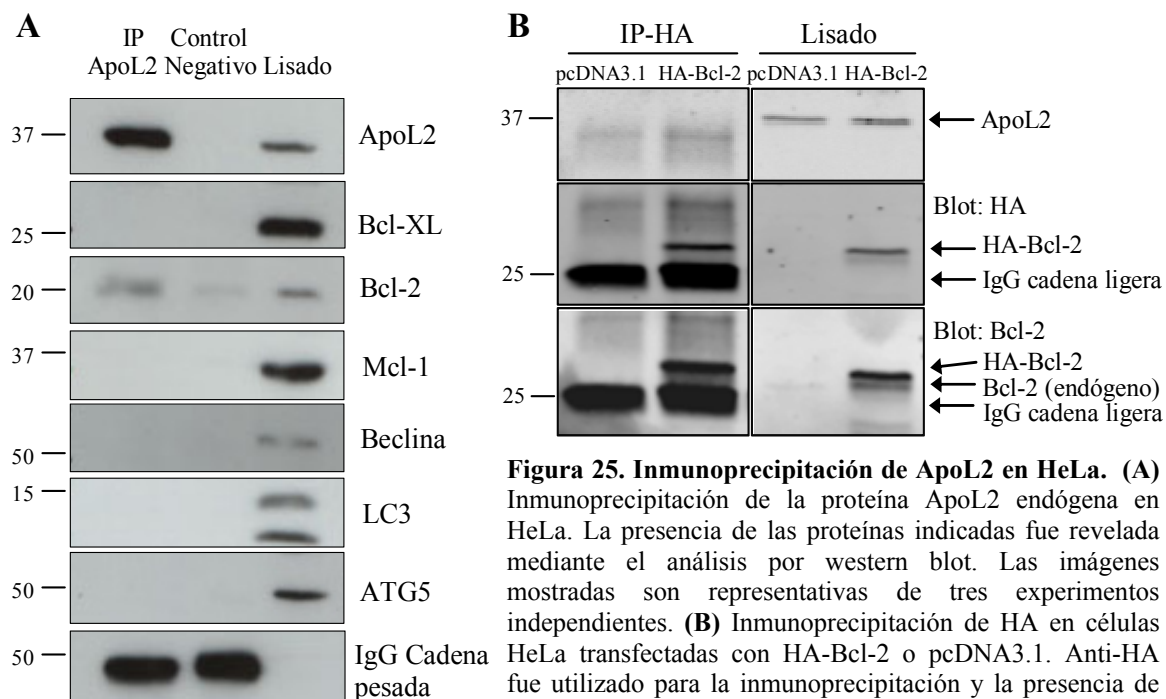
Hemos observado solamente una diferencia menor en cuanto a la muerte celular inducida mediante actinomicina D en células control frente a las células transfectadas con la secuencia siRNA ApoL2-II, pero no frente a la secuencia siRNA ApoL2-III. Tratamos las células con TNF- $\alpha$  y cicloheximida con el fin de bloquear la respuesta celular de síntesis de proteínas y forzar así la inducción de muerte celular. Como muestra la figura 24, el silenciamiento de ApoL2 no modifica los valores de muerte del tratamiento. ApoL2 no es inducida por TNF- $\alpha$  (Figura 21) y tampoco parece tener un rol decisivo en la señalización de la respuesta frente a este estímulo.

Así pues, basándonos en los resultados obtenidos y mostrados en la figura 24, podemos concluir que ApoL2 no regula la muerte celular inducida por estos estímulos ni se comporta como una proteína Bcl-2 antiapoptótica (Liao *et al.*, 2011) ni como una proteína BH3-only como lo hacen otras ApoL (Vanhamme *et al.*, 2003; Vanhollebeke and Pays, 2006; Wan *et al.*, 2008).

### **6. ApoL2 interacciona levemente con Bcl-2.**

Aunque no hemos identificado el papel de ApoL2 en relación a la muerte celular, no por ello ApoL2 deja de ser una posible candidata a ser una proteína BH3-only ya que existen otras proteínas BH3-only que no regulan la muerte celular. Algunas, como por ejemplo Beclina-1, regulan la autofagia a través de su interacción con proteínas de la familia Bcl-2. Se ha descrito que ApoL6, quien induce muerte celular e inhibe autofagia, puede unirse a Bcl-xL (Zhaorigetu *et al.*, 2011). Por ello tratamos de ver interacción de ApoL2 con otras proteínas que contienen el dominio BH3, ya que las proteínas de la familia Bcl-2 utilizan el dominio BH3 para unirse entre ellas (Lomonosova and Chinnadurai, 2008). Inmunoprecipitamos ApoL2 e incubamos la membrana con anticuerpos frente a proteínas de la familia Bcl-2. Bcl-2 fue inmunoprecipitada con ApoL2 en repetidas ocasiones (Figura 25A), pero en cambio fuimos incapaces de inmunoprecipitar ApoL2 a partir de la inmunoprecipitación de

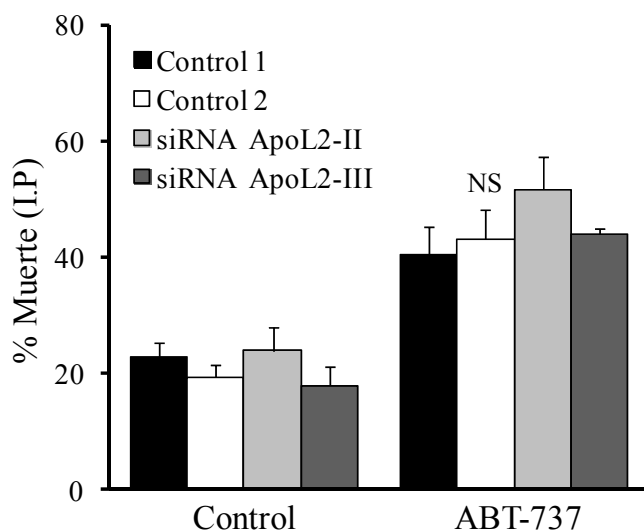
Bcl-2. Por esta razón, y para confirmar esta interacción de otra manera distinta, sobreexpresamos HA-Bcl-2 y lo inmunoprecipitamos utilizando el anticuerpo frente a HA, pero en estas condiciones no conseguimos obtener señal de ApoL2. Tampoco conseguimos ver señal de HA al inmunoprecipitar ApoL2 en HeLa transfectadas con el plásmido HA-Bcl-2 (datos no mostrados).



**Figura 25. Inmunoprecipitación de ApoL2 en HeLa.** (A) Inmunoprecipitación de la proteína ApoL2 endógena en HeLa. La presencia de las proteínas indicadas fue revelada mediante el análisis por western blot. Las imágenes mostradas son representativas de tres experimentos independientes. (B) Inmunoprecipitación de HA en células HeLa transfectadas con HA-Bcl-2 o pcDNA3.1. Anti-HA fue utilizado para la inmunoprecipitación y la presencia de ApoL2, Bcl-2 y HA fue revelada mediante western blot. La figura mostrada es representativa de 3 experimentos independientes. Los paneles de la izquierda y de la derecha pertenecen al mismo gel.

### 6.1. ApoL2 no influye en la muerte por ABT-737.

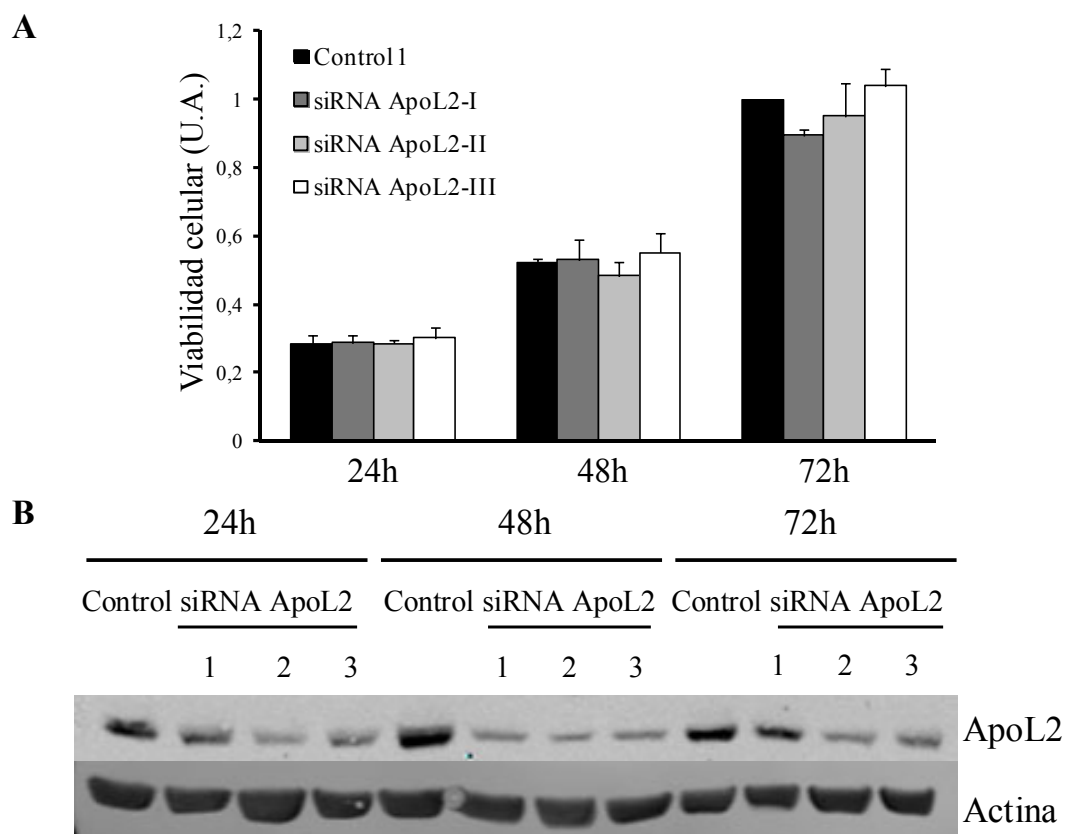
Quisimos conocer si la débil interacción entre ApoL2 y Bcl-2 podría afectar a la sensibilidad de HeLa frente al tratamiento con ABT-737, un inhibidor de las proteínas de la familia Bcl-2. El silenciamiento transitorio de ApoL2 no alteró la tasa de muerte inducida por ABT-737 tal y como se puede observar en la figura 26.



**Figura 26. La proteína ApoL2 no interviene en la citotoxicidad inducida por ABT-737.** Células HeLa fueron transfectadas con diferentes secuencias siRNA control y siRNA frente a la proteína ApoL2 y tratadas a las 24 horas tras transfección con ABT-737 30  $\mu$ M durante 24 horas. La gráfica muestra la media y S.E.M de 5 experimentos independientes.

### 6.2. ApoL2 no regula el ciclo celular.

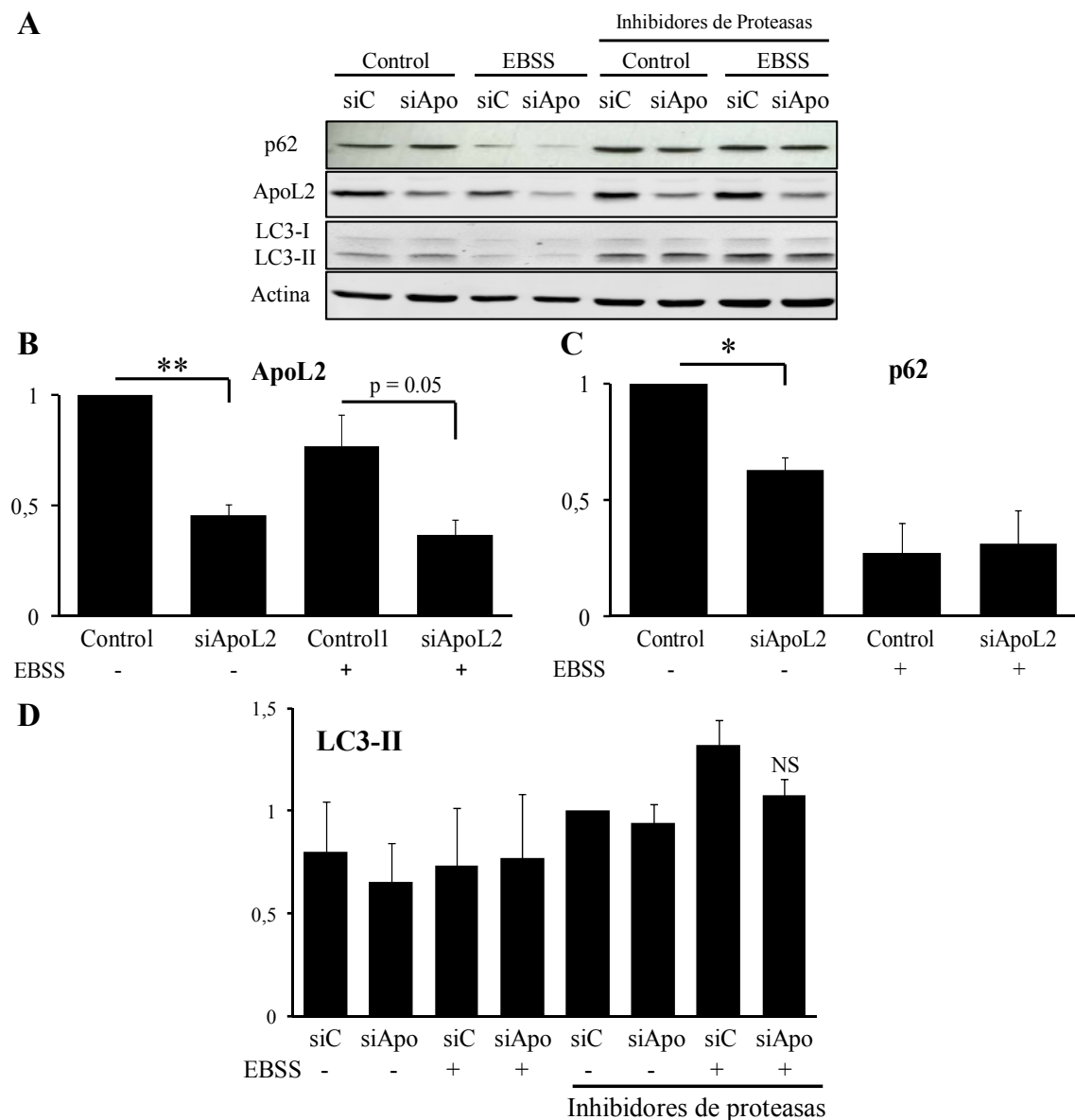
Otra posible función de esta proteína es que pueda formar parte de la maquinaria celular que se encarga de la regulación del ciclo celular. Nuestra hipótesis fue que podría hacerlo a través de la unión a Bcl-2 y/o a lípidos señal. Para averiguar si ApoL2 participa en la regulación del ciclo celular, realizamos el silenciamiento transitorio de la proteína mediante el uso de tres secuencias distintas de siRNA frente a ApoL2 y medimos la proliferación celular mediante cristal violeta. Pero como queda claramente demostrado en la figura 27A, la viabilidad y la proliferación celular no se ven afectadas al eliminar gran parte de la proteína con tres secuencias de siRNA. La efectividad del silenciamiento fue comprobada mediante western blot (Figura 27B).



**Figura 27. ApoL2 no afecta al ciclo celular.** Células HeLa transfectadas con tres secuencias siRNA frente a ApoL2 y una secuencia control fueron sometidas a la técnica de cristal violeta (A) y a western blot (B) a diferentes tiempos. U.A.: Unidades Arbitrarias.

### 6.3. ApoL2 podría regular la autofagia basal pero no la inducida.

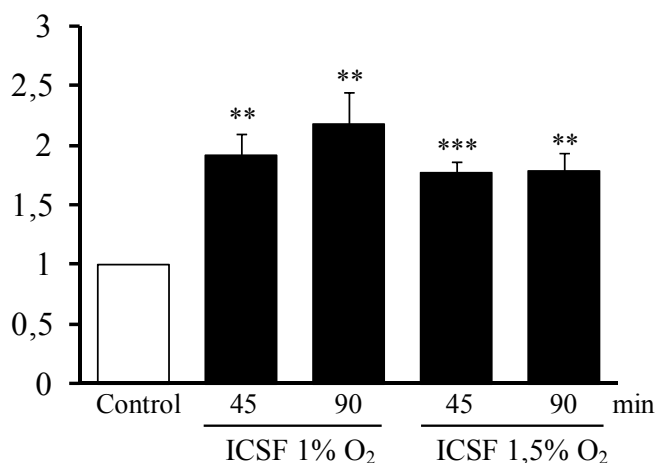
Por último, investigamos si ApoL2 podría actuar como Beclina-1 o ApoL6 regulando la autofagia. Silenciamos de nuevo de forma transitoria ApoL2 (Figura 28A y B) y medimos la autofagia basal mediante la cuantificación de dos marcadores como LC3 lipidado y la degradación de la proteína p62. Pudimos comprobar que la bajada o eliminación parcial de ApoL2 no alteraba los niveles de LC3-II (Figura 28A y C) aunque sí conducía a una bajada en la cantidad de p62 (Figura 28D), lo que podría considerarse como un ligero aumento en la autofagia. Este resultado podría sugerir que ApoL2 podría estar regulando la autofagia basal celular. Con el fin de inducir autofagia en estas células transfectadas, se realizó un tratamiento con medio EBSS (Tabla 1). Asimismo, se añadieron inhibidores de proteasas con el fin de bloquear el flujo autofágico y poder cuantificarlo. Nuestros resultados muestran que el silenciamiento de ApoL2 no altera los niveles de autofagia inducidos por el tratamiento con EBSS basados en los niveles de LC3-II y de p62 (Figura 28A, C y D).



**Figura 28. ApoL2 no participa en la regulación de la autofagia inducida por retirada de nutrientes y factores tróficos en HeLa.** Análisis del flujo autofágico en células HeLa transfectadas con siRNA Control 1 (siC) o siRNA ApoL2-II (siApo) durante 48 horas y tratadas con EBSS durante 6 horas. Los inhibidores de proteasas pepstatina y E64D (10 mM cada uno) fueron usados para bloquear el flujo autofágico. El western blot en (A) es representativo de tres experimentos independientes. Los niveles de ApoL2 en (B) fueron cuantificados y ponderados frente a los niveles de ponceau o actina y posteriormente normalizados frente a las células transfectadas con Control 1 y sin tratar. (C) cuantificación de los niveles relativos de LC3-II. Los datos fueron ponderados a ponceau o actina y normalizados frente a las células transfectadas con inhibidores de proteasas como control de autofagia basal. (D) Cuantificación de los niveles relativos de p62 (ponderados frente a ponceau o actina) normalizados frente a células transfectadas con Control 1 sin tratar. (B, C, D) Las gráficas muestran la media y S.E.M de 3 experimentos independientes.

## 7. Efectos de la privación de oxígeno y glucosa (OGD) en neuronas corticales de embriones de ratón.

Para poner a punto el tratamiento de simulación de la isquemia, OGD (del inglés *Oxygen-Glucose Deprivation*), realizamos una dosis-respuesta de privación de oxígeno y glucosa para conocer los efectos provocados a diferentes intensidades. Tratamos las neuronas con el tampón sin glucosa ICSF en hipoxia al 1% y al 1,5% de O<sub>2</sub> durante 45 y 90 minutos, tras los cuales dejamos las células recuperándose en normoxia y en medio condicionado durante 24 horas. De esta manera, comprobamos que las diferencias entre los tratamientos al 1% y 1,5% O<sub>2</sub> son prácticamente nulas y que la duración del tratamiento OGD influye pero de forma muy ligera (Figura 29).

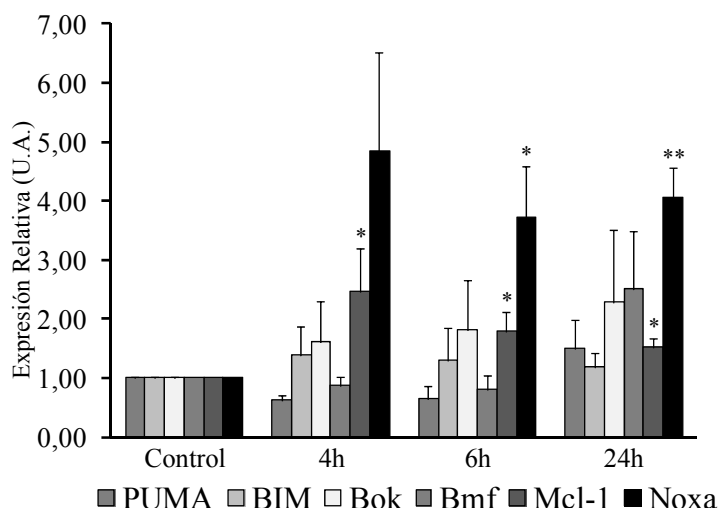


**Figura 29. Dosis respuesta de neuronas corticales frente a la falta de oxígeno y glucosa.** Neuronas corticales tratadas con medio ICSF durante 45 o 90 minutos en atmósferas que contenían el 1% o el 1,5% O<sub>2</sub>. Muerte total determinada mediante la medida de LDH liberada al medio. La gráfica muestra la media y S.E.M de 7 experimentos independientes.

### 7.1. Alteraciones moleculares inducidas por OGD.

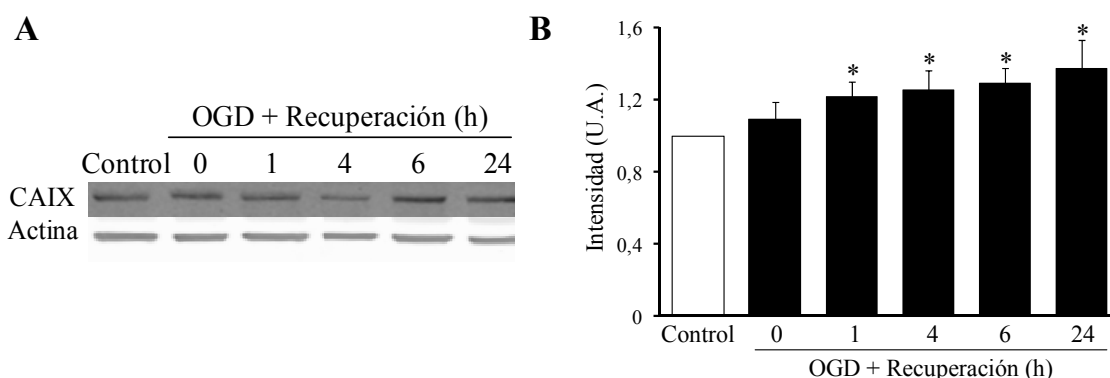
Nuestro objetivo primordial en este modelo fue tratar de caracterizar el tipo de muerte que se induce e identificar las proteínas clave que intervienen en este proceso, para tratarlas como dianas terapéuticas frente al ictus. Dado que gran parte de la literatura relaciona las proteínas de la familia Bcl-2 con este tipo de muerte celular (Broughton *et al.*, 2009; Chelluboina *et al.*, 2014; Choi, 1996), se realizó una q-PCR de algunas de las posibles proteínas que podrían estar involucradas en este proceso (esto es trabajo previo a mi incorporación al proyecto). Por un lado, la proteína antiapoptótica Mcl-1 está claramente inducida a las 4 horas de recuperación y decrece ligeramente hasta las 24 horas, pero aun manteniendo niveles superiores a los basales (Figura 30). Por otro lado, encontramos dos proteínas BH3-only proapoptóticas inducidas por el estímulo isquémico. El mensajero de Noxa aparece

inducido a las 4 horas de recuperación tras OGD, expresándose cuatro veces más que en las células control y manteniéndose hasta las 24 horas. Mientras, Bmf parece tener una moderada inducción a las 24 horas tras OGD (Figura 30).



**Figura 30. Modificaciones en los niveles de mensajero de las proteínas Bcl-2 tras OGD.** q-PCR de los niveles de mensajero en neuronas corticales sometidas a OGD (1,5% O<sub>2</sub>) durante 45 minutos y distintos tiempos de recuperación. El gráfico muestra la media y S.E.M de 3 experimentos independientes.

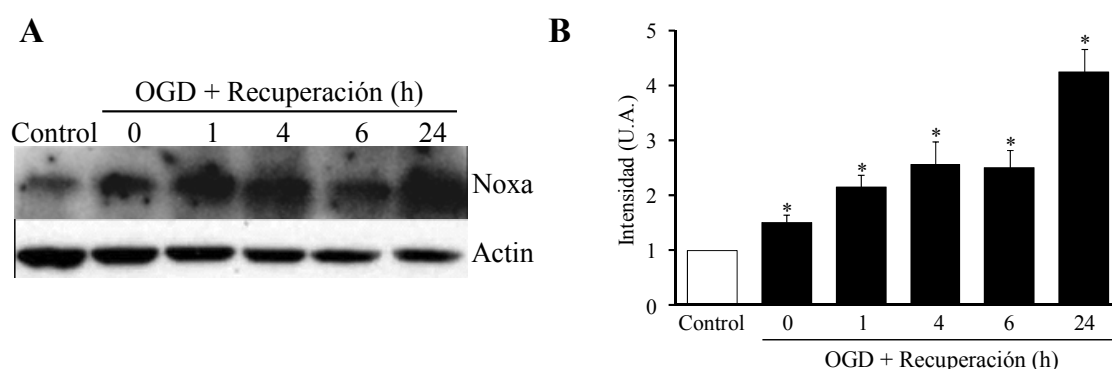
Existen diversas moléculas ampliamente descritas como marcadores de la hipoxia. Quizás los más utilizados son HIF-1 (del inglés *Hypoxic Inducible Factor-1*) glut-1 y las anhidrasas carbónicas (Ford *et al.*, 2006; Vascotto *et al.*, 2006). Después de intentar ver la proteína HIF-1 sin éxito, decidimos comprobar los niveles de la CAIX (anhidrasa carbónica 9). La inducción de esta anhidrasa está considerada un marcador de hipoxia sobre todo en tumores sólidos. Hemos podido comprobar que en nuestro modelo también se puede observar una leve aunque significativa inducción de CAIX en neuronas sometidas a OGD y recuperación (OGD/R, Figura 31).



**Figura 31. Inducción de CAIX tras el tratamiento OGD en neuronas corticales.** (A) Western blot de neuronas corticales tratadas durante 45 minutos con ICSF en hipoxia (1% de O<sub>2</sub>) seguido de recuperación en medio condicionado a distintos tiempos. Imagen representativa de 10 experimentos independientes. (B) Cuantificación de western blot por densitometría. Los datos mostrados representan la media y S.E.M. de 10 experimentos independientes.

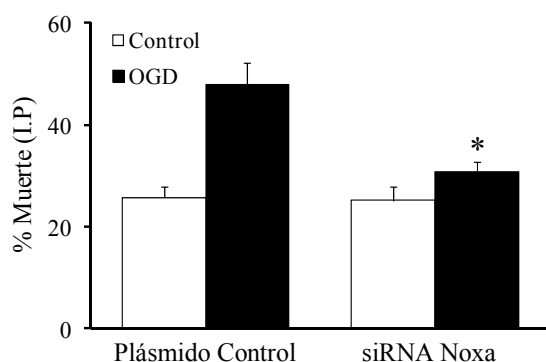
## 8. Noxa interviene en la muerte inducida por OGD.

Dado que los niveles de Noxa aumentan drásticamente a las 4 horas del tratamiento, nos pareció que Noxa podría ser una buena candidata para ser identificada como responsable o inductora de la muerte frente a este estímulo. Para demostrarlo, primero comprobamos que los niveles de proteína también aumentaban tras el tratamiento. Tal y como se observa en la figura 32, la proteína de la familia Bcl-2 está inducida desde el momento en el que sometemos las células a la recuperación en medio condicionado, llegando su máxima expresión a las 24 horas tras OGD.



**Figura 32. Noxa es inducida en neuronas corticales embrionarias de ratón tras el tratamiento OGD.** (A) Western blot de neuronas corticales tratadas durante 45 minutos con ICSF en hipoxia (1% de O<sub>2</sub>) seguido de recuperación en medio condicionado a distintos tiempos. Imagen representativa de 4 experimentos independientes. (B) Cuantificación de western blot por densitometría de 4 experimentos independientes. Los datos representan la media y S.E.M. de dichos experimentos.

Para conocer si la inducción de Noxa jugaba un papel protagonista en la muerte por isquemia, transfectamos las neuronas corticales durante el día 7 de cultivo con un plásmido que codifica para siRNA frente a Noxa y las tratamos a las 48 horas de la transfección. Los resultados fueron claramente resolutivos. El silenciamiento de esta proteína protege las neuronas frente al tratamiento OGD/R aproximadamente un 35% frente al plásmido control (Figura 33).

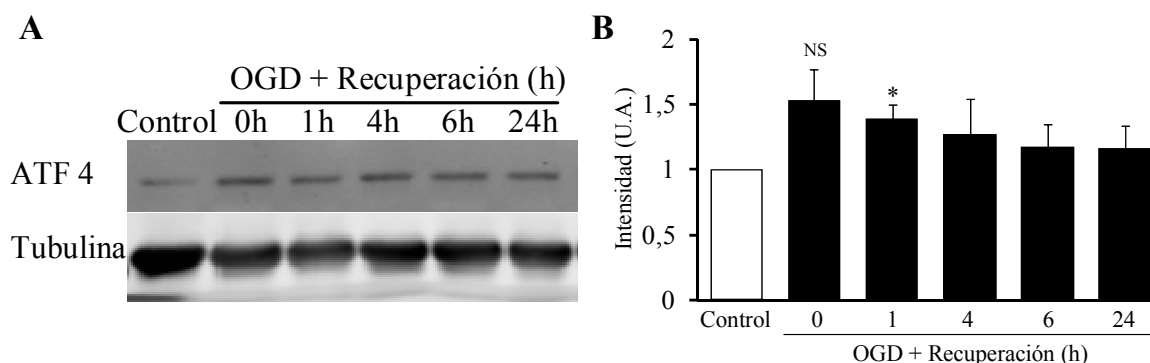


**Figura 33. El silenciamiento de Noxa protege frente a OGD.** Neuronas corticales transfectadas el día 7 en cultivo con un plásmido que codifica para siRNA frente a Noxa fueron tratadas 48 horas después de la transfección con ICSF en 1% O<sub>2</sub> + 24 horas de recuperación antes de medirse la muerte mediante conteo de células con incorporación de yoduro de propidio. Se muestra la media y S.E.M. de 3 experimentos independientes.



El mensajero de la proteína Bmf aparecía sobreexpresado a las 24 horas de recuperación, por lo que realizamos western blots para tratar de ver si la inducción se realizaba también a nivel de proteína. Se utilizaron para este fin tres anticuerpos diferentes, pero ninguno de ellos ha funcionado en nuestro modelo. Mediante el empleo de un anticuerpo producido en el laboratorio de Andreas Villunger en Innsbruck, nuestros colaboradores del laboratorio de Jochen Prehn, (Dublín) determinaron que efectivamente, Bmf se induce a las 24 horas tras OGD y que el ratón deficiente en esta proteína, tenía menor volumen de área infartada que los WT (Pfeiffer *et al.*, 2014).

Por último, medimos también los niveles de ATF4 mediante western blot porque ATF4 es un posible candidato a ser el responsable de inducir la sobreexpresión de Noxa. Noxa y ATF4 han sido relacionados con la muerte bajo estrés metabólico en distintos modelos (Ramirez-Peinado *et al.*, 2011). Como podemos observar en la figura 34, ATF4 aumenta tras el estímulo isquémico y debido a la alta variabilidad en su inducción, sólo los valores a una hora de recuperación en medio condicionado, son significativos.



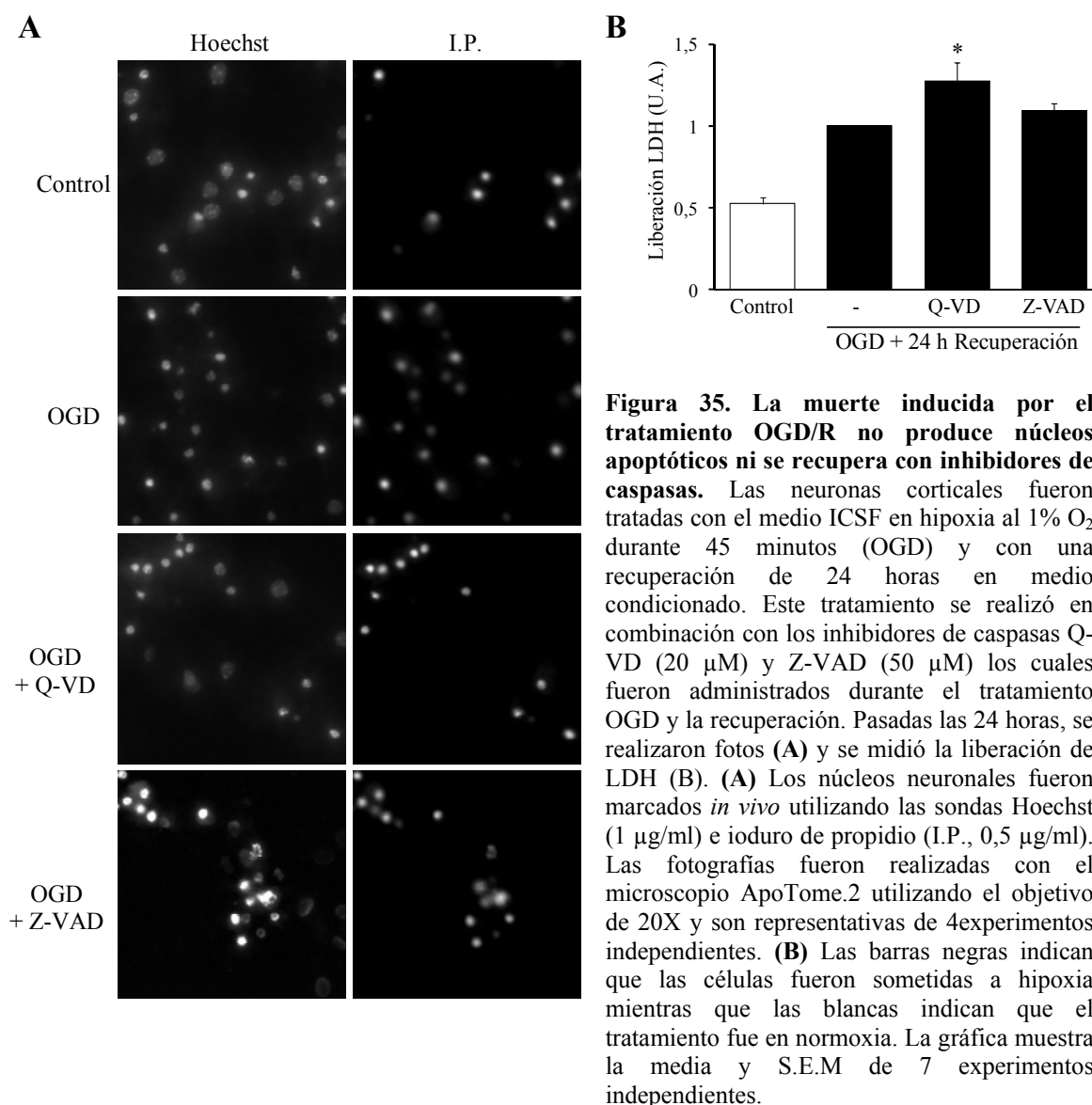
**Figura 34. ATF4 es inducido por el tratamiento OGD/R.** Western blot de neuronas corticales de embrión de ratón sometidas a OGD (medio ICSF en 1% O<sub>2</sub>) durante 45 minutos y diferentes tiempos de recuperación en medio condicionado. A los controles se les sometió a un cambio de medio durante 45 minutos y se les devolvió el medio condicionado durante 24 horas. **(A)** La imagen mostrada es representativa de cinco experimentos independientes. **(B)** Se muestran la media y S.E.M de 5 experimentos independientes.

## **9. La muerte por OGD/R no se debe principalmente a la apoptosis.**

El aumento de proteínas BH3-only tras el tratamiento OGD/R podría justificar que la muerte celular que se produce sea consecuencia de la activación de la apoptosis. Algunos autores ya habían descrito la activación de esta vía en diversos modelos (Badiola *et al.*, 2009; Velier *et al.*, 1999).

### **9.1. Los inhibidores de caspasas no protegen frente a OGD/R.**

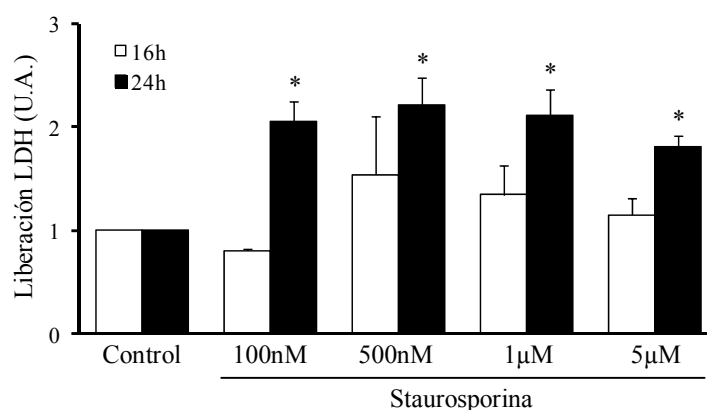
Para averiguar si esta hipótesis era cierta y conocer qué porcentaje de la muerte neuronal se debía a la apoptosis, realizamos el tratamiento OGD/R combinado con inhibidores de caspasas. Los inhibidores incubados durante el tratamiento y durante la recuperación no sólo no fueron suficientes para recuperar la viabilidad celular tras el tratamiento, sino que en el caso de la combinación con Q-VD, la muerte se vio incrementada (Figura 35B). Tampoco pudimos observar los núcleos picnóticos y fragmentados tan típicos de la apoptosis en nuestro tratamiento OGD/R utilizando el medio ICSF y marcando el ADN neuronal mediante las sondas Hoechst e yoduro de propidio (Figura 35A). Aunque el marcaje con una sola sería suficiente, al hacerlo doble tenemos más información del estado del núcleo y de si la célula tiene la membrana rota. El marcaje se realiza en células vivas y de forma que el Hoechst entra en todas las neuronas y el yoduro de propidio solamente en las muertas.



En las fotos de la figura 35A, podemos ver imágenes representativas de nuestros cultivos neuronales en el día 10 *in vitro*. Las células controles sufren el mismo tratamiento que las demás salvo por el hecho de que su cambio de medio se hace a medio neurobasal nuevo durante el tiempo del tratamiento y después se le devuelve el medio condicionado. Esto quiere decir que la muerte basal en nuestras condiciones ha de ser la de los controles, y como se muestra en la imagen, nuestra muerte basal se aproxima al 35-40%. El tratamiento combinado de OGD junto con inhibidores de caspasas no disminuye el número de núcleos positivos para ioduro de propidio (Figura 35A). La figura 35B cuantifica y demuestra que el uso de inhibidores de caspasas no disminuye los niveles de muerte provocados por el tratamiento OGD/R.

## 9.2. No encontramos evidencias de activación de caspasas.

Para poder estudiar el posible papel de la apoptosis en este modelo, primero buscamos un control positivo de células que mueren por apoptosis. Para ello, tratamos las neuronas con Staurosporina (STS) a diferentes concentraciones y medimos la muerte producida a 16 y 24 horas. Como se puede ver en la figura 36, la muerte inducida por STS no depende tanto de la concentración como del tiempo. A 24 horas, todas las concentraciones inducen el doble de muerte que los controles.

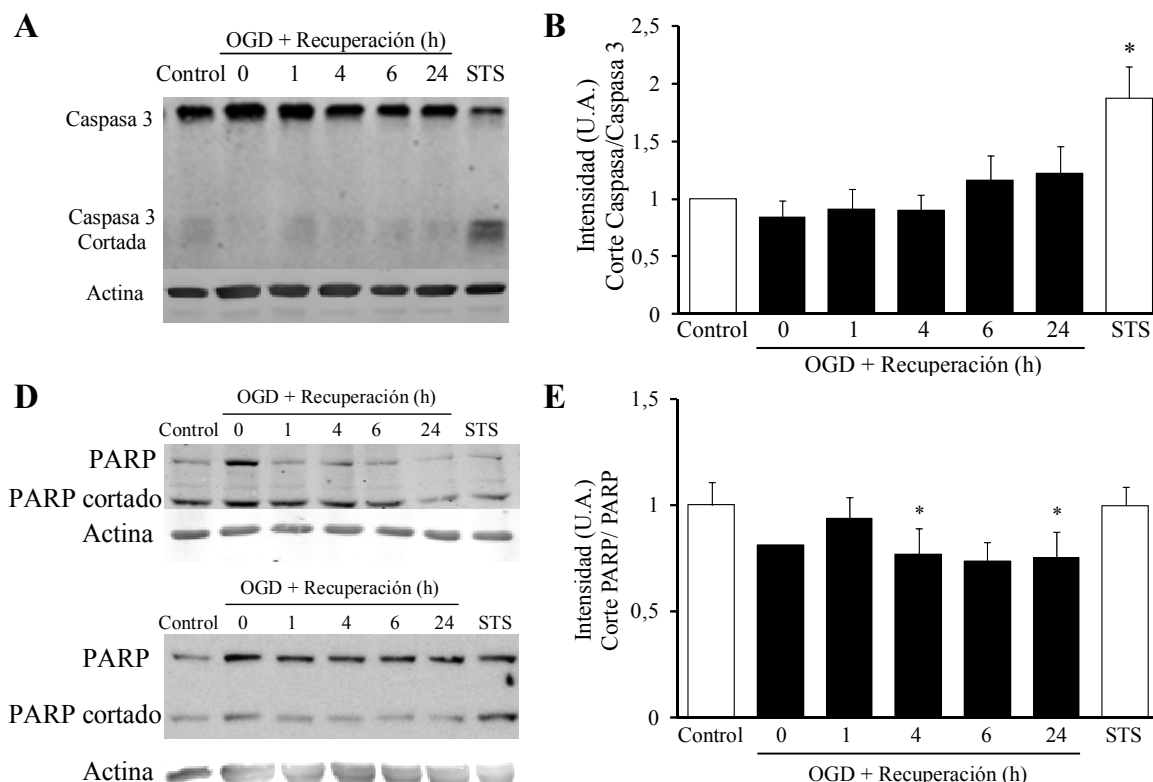


**Figura 36. Cinética y dosis-respuesta de Staurosporina en neuronas corticales de embriones de ratón.** Las neuronas fueron tratadas con Staurosporina a diferentes concentraciones durante 16 y 24 horas antes de analizar la liberación de LDH. \* indica diferencias significativas frente a su control. Se muestra la media y S.E.M. de 3 experimentos independientes.

Una vez que conocíamos la cinética de muerte con STS y que ésta produce corte de caspasa 3 (Figura36), pudimos incluir tratamientos con esta sustancia como control positivo de apoptosis.

El hecho de que la inhibición de la apoptosis no produzca un aumento de la viabilidad celular puede deberse a que, al inhibir este fenómeno, tiene lugar un cambio en el tipo de muerte celular y por eso no observamos protección con los inhibidores de caspasas. Para constatar si las células tras el tratamiento morían por apoptosis, analizamos dos marcadores moleculares que indican activación de caspasas como son el corte de caspasa 3 y de PARP. La forma cortada de la caspasa 3 indica que esta molécula está activa mientras que PARP es sustrato de caspasas activas, por lo que el corte de esta proteína también indica de forma indirecta que hay caspasas activas. Los western blots de neuronas corticales tratadas con OGD, y recogidas a diferentes tiempos de recuperación revelaron que no existe corte de significativo de la caspasa 3 (Figura 37A y B), ni tampoco de PARP, en las 24

primeras horas de recuperación (Figura 37C y D). La detección de PARP y PARP cortado mediante western blot ha resultado de lo más variable y es por eso por lo que se muestran dos imágenes de experimentos diferentes (Figura 37D). No obstante, la cuantificación de 8 experimentos independientes nos indica que en nuestro modelo no hay corte de PARP.

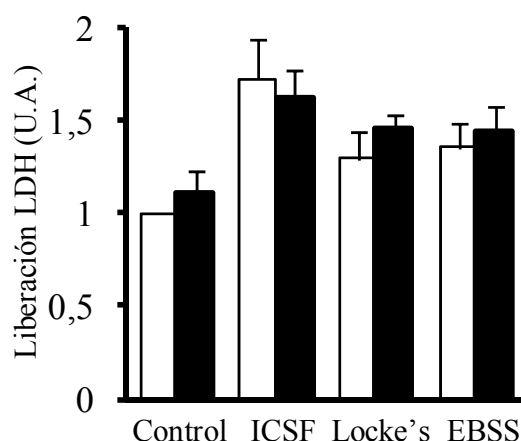


**Figura 37. El tratamiento OGD no induce corte de caspasa 3 de forma significativa.** Las neuronas fueron tratadas con ICSF a 1% O<sub>2</sub> y recogidas a diferentes tiempos de recuperación. Como control de corte de caspasa 3, las células fueron tratadas con Staurosporina (STS 1  $\mu$ M) en normoxia. **(A)** Western blot mostrando caspasa 3 y el corte de caspasa 3. El blot mostrado es representativo de 6 experimentos. **(B)** Cuantificación del corte de caspasa 3 frente a la caspasa total. La gráfica muestra la media y S.E.M de 6 experimentos independientes. Las barras blancas indican que los tratamientos fueron realizados en normoxia, mientras que las negras indican que fueron realizados en hipoxia. **(C)** Dos western blots mostrando PARP y el corte de PARP que muestran la variabilidad del patrón de PARP y PARP cortado. **(D)** Cuantificación del corte de PARP frente a la molécula PARP sin cortar. La gráfica muestra la media y S.E.M de 8 experimentos independientes. Las barras blancas indican que los tratamientos fueron realizados en normoxia, mientras que las negras fueron realizados en hipoxia.

## 10. Caracterización de los efectos producidos por diferentes tampones OGD.

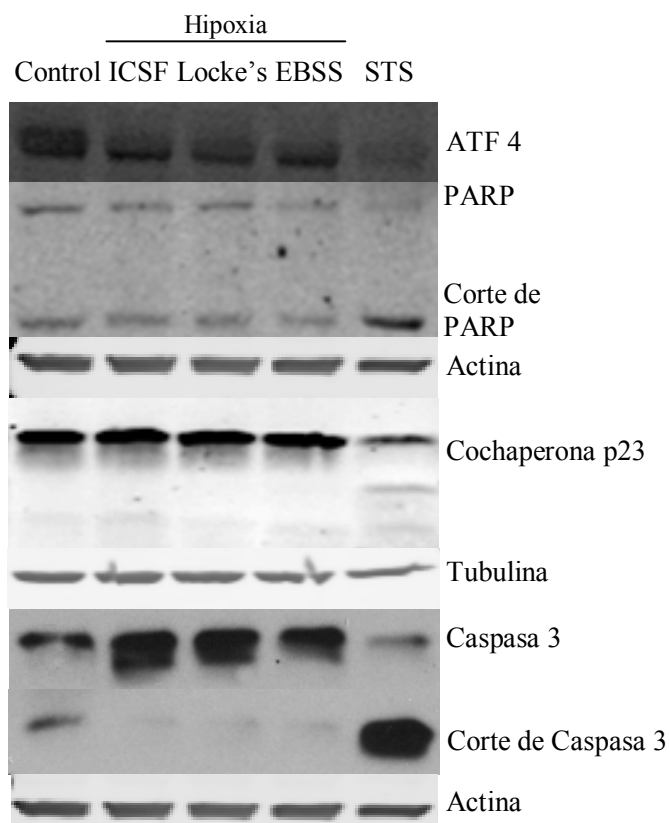
La variedad en los resultados aportados por grupos de todo el mundo podría deberse a las diferencias entre los modelos *in vitro*. Podría no ser trivial escoger con tino el tampón a utilizar para tratar de mimetizar los efectos de la isquemia *in vivo*, ya que la presencia o ausencia de ciertas moléculas, así como su concentración, podría provocar diferentes reacciones en las células.

Por ésta razón, decidimos caracterizar las diferencias en la tasa de muerte y en los marcadores moleculares de muerte inducidos por el tratamiento con diferentes tampones en condiciones de hipoxia. Según muestran nuestros resultados, el tampón ICSF es el más dañino para las células mientras que entre el tampón de Locke's y el EBSS no parece haber diferencias importantes (Figura 38). No obstante, los tampones EBSS y Locke's inducen menor muerte en normoxia que en hipoxia (Figura 38), mientras que en el caso de ICSF la muerte es mayor en normoxia que en hipoxia (Figura 38).



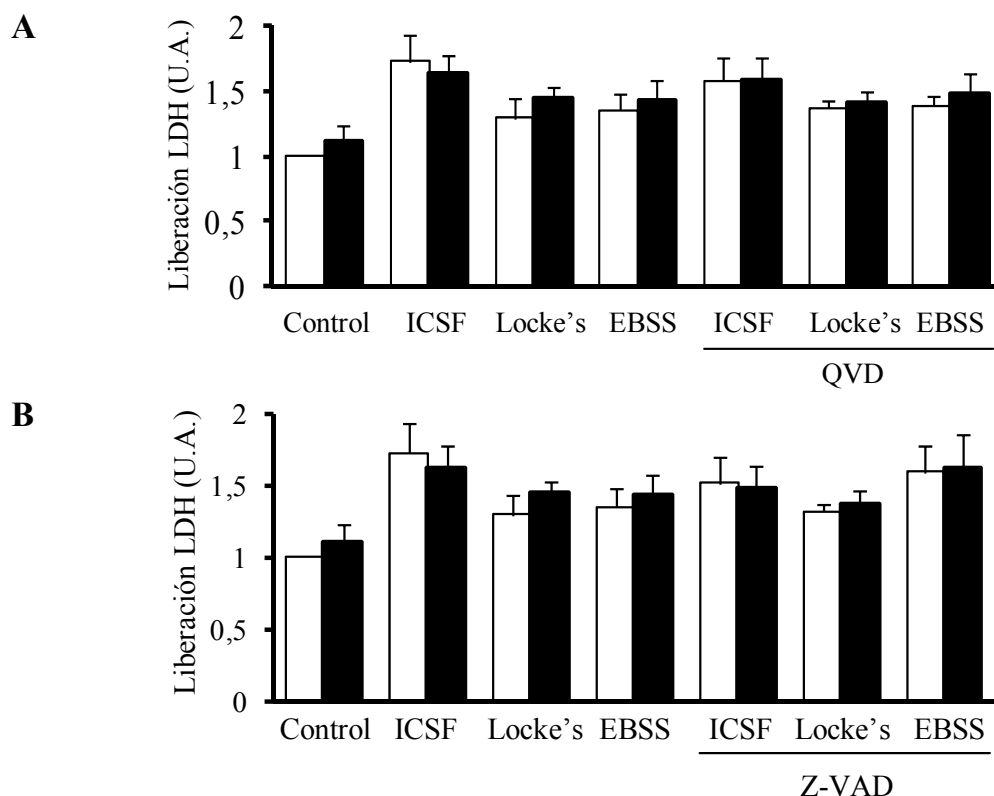
**Figura 38. Comparación de la muerte celular utilizando diferentes medios OGD.** Neuronas corticales primarias fueron sometidas al tratamiento con diferentes medios para simular isquemia durante 45 minutos y 24 horas de recuperación en medio condicionado. Las barras blancas indican que la incubación fue realizada en normoxia mientras que las barras negras señalan que los tratamientos fueron realizados en hipoxia (1,5% O<sub>2</sub>). La gráfica muestra la media y S.E.M. de 4 experimentos independientes.

Por otro lado, analizamos también los niveles de ciertas proteínas que nos podrían indicar algún tipo de diferencia entre la respuesta que induce cada tampón. En primer lugar, cabe destacar que en nuestros experimentos ningún tampón induce apoptosis de forma masiva. No se advierte corte de caspasa 3 ni tampoco corte de la cochaperona p23, por lo que no existen indicios de apoptosis en nuestro modelo (Figura 39). Tampoco aquí encontramos grandes evidencias del corte de PARP. Parece que ninguna condición de OGD/R tiene mayores niveles de PARP cortado que los controles, pero sí que hemos detectado que la molécula PARP sin cortar desaparece en el tratamiento con EBSS pudiendo indicar que en estas condiciones hay cierto nivel de corte de PARP. Los niveles de ATF4 en el tratamiento con ICSF y EBSS parecen aumentar ligeramente si los comparamos con el control y con el tampón de Locke's.



**Figura 39. Patrón de marcadores moleculares en neuronas tratadas con distintos tampones OGD.** Neuronas tratadas durante 45 minutos con tres medios distintos bajo condiciones de hipoxia (1,5% O<sub>2</sub>) fueron analizadas mediante western blot. Anticuerpos frente a PARP, ATF4, cochaperona p23, caspasa 3, actina, tubulina y anhidrasa carbónica 9 (CAIX) se utilizaron con tal fin. Como control de muerte celular se utilizó STS 500 nM durante 24 horas. Se muestran westerns blots representativos de 4 experimentos independientes.

El medio EBSS sin glucosa ha sido el utilizado en variedad de trabajos *in vitro* donde se ha detectado corte de caspasa 3 y, en definitiva, apoptosis. Comprobamos de nuevo que en nuestros experimentos no se produce apoptosis al no conseguir recuperar la viabilidad celular con los inhibidores de caspasas (Figura 40).



**Figura 40. Comparación entre los distintos medios para inducir OGD en combinación con inhibidores de caspasas.** Neuronas corticales primarias fueron sometidas al tratamiento con diferentes medios para simular isquemia durante 45 minutos. Las barras blancas indican que la incubación fue realizada en normoxia mientras que las barras negras señalan que los tratamientos fueron realizados en hipoxia (1,5% O<sub>2</sub>). Se muestran la media y S.E.M. de 4 experimentos independientes.

## 11. La muerte por OGD/R tiene un componente necrótico.

### 11.1. La inhibición de la apertura del PPTM protege de la isquemia.

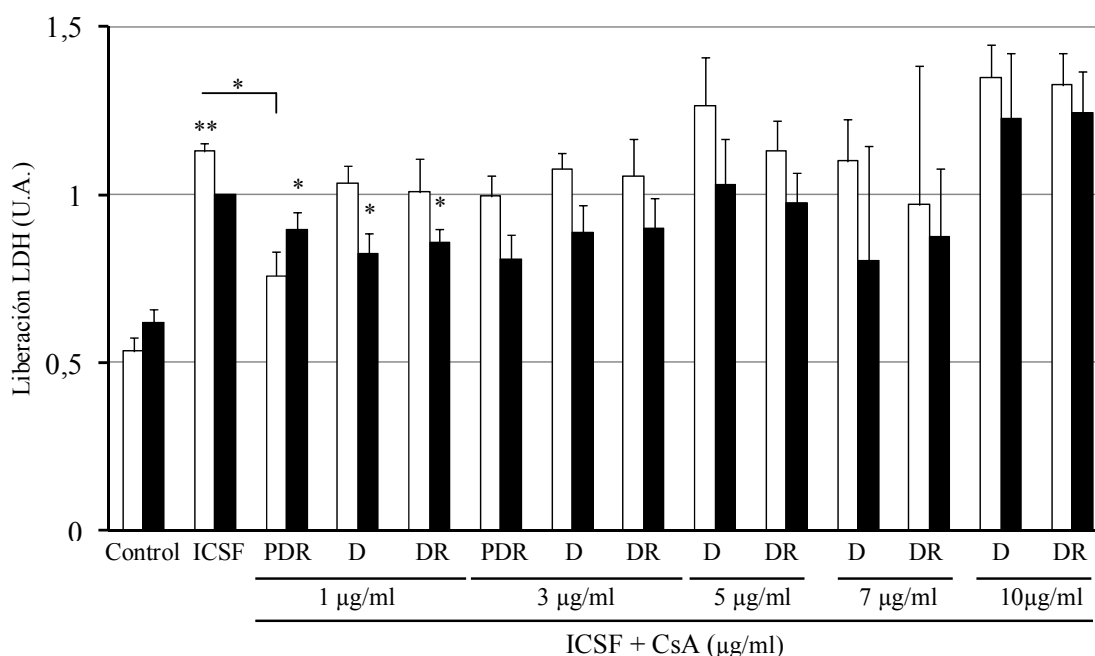
Dado que la muerte neuronal no se produce a través de la apoptosis principalmente, tratamos de averiguar si se debía a la apertura del poro de permeabilidad de la mitocondria. Algunos autores ya habían descrito *in vivo* (Yu *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2013) e *in vitro* que el uso de ciclosporina A (a partir de ahora CsA) protege frente a la isquemia (Borlongan *et al.*, 2005). Para dilucidar si efectivamente, en nuestro modelo, la muerte masiva neuronal tras el tratamiento OGD/R se producía como consecuencia de la apertura del PPTM, realizamos el tratamiento en combinación con diferentes dosis de CsA.

Como se puede observar en la figura 41, la administración de CsA previene el daño por OGD siempre que ésta sea administrada antes de la fase de recuperación. La máxima protección se observa cuando se añade la CsA una hora antes del



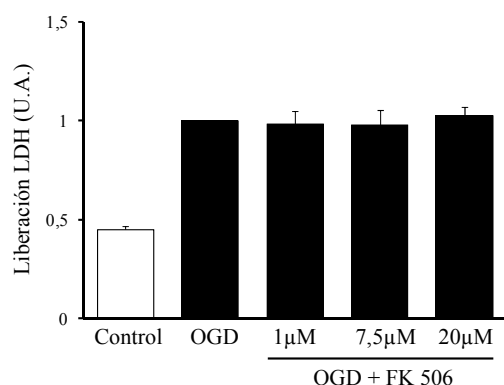
tratamiento OGD. El efecto neuroprotector de la CsA es mucho más evidente (y significativo) cuando tratamos a 1  $\mu\text{g/ml}$  que a dosis mayores.

Cabe resaltar que el medio ICSF en normoxia resulta más tóxico que en hipoxia (OGD). Esto en un principio nos pareció extraño, pero resultó estar ya descrito en la línea celular SH-SY5Y (Kogel *et al.*, 2006). Por tanto, parece que es mucho más dañina la falta de nutrientes en sí que el hecho de que las neuronas no tengan oxígeno para poder realizar la respiración mitocondrial. En otras palabras, la hipoxia protege frente a la privación de nutrientes en neuronas de ratón. Por último, también hemos de destacar que la CsA previene el daño inducido por el ICSF al ser administrada una hora antes del tratamiento de privación de nutrientes (Figura 41).



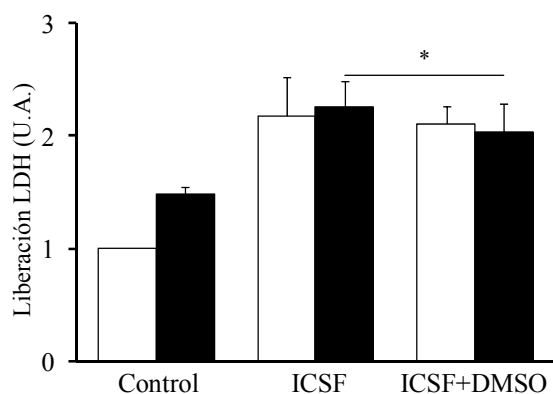
**Figura 41. Efecto protector de la CsA frente al tratamiento OGD.** Neuronas tratadas con ICSF en combinación con CsA fueron analizadas mediante la liberación de LDH. PDR indica que la CsA fue administrada una hora antes del tratamiento con ICSF, durante este tratamiento y durante el periodo de recuperación en medio condicionado. D hace referencia a que la CsA solamente fue administrada durante el tratamiento con ICSF. DR significa que la CsA estaba presente durante el tratamiento con ICSF y durante la recuperación. Las barras blancas indican condiciones de normoxia y las negras 1% O<sub>2</sub>. A todas las condiciones que no fueron tratadas con CsA, se les añadió el vehículo de esta: DMSO. La gráfica muestra la media y S.E.M de 4 experimentos independientes (salvo por la concentración de 7  $\mu\text{g/ml}$  en la que  $n=2$ ). Los asteriscos indican diferencias significativas frente a ICSF en hipoxia a menos que se indique lo contrario.

La CsA además de inhibir la apertura del poro, también puede inhibir la actividad fosfatasa de la calcineurina. Para constatar que los efectos descritos anteriormente son debidos a la inhibición de la apertura del PPTM, hemos realizado un tratamiento combinado de OGD junto con el inhibidor de la calcineurina, FK506 (también conocido como tacrolimus). El hecho de que esta droga no modifique la citotoxicidad inducida por el tratamiento OGD (Figura 42), nos lleva a la conclusión de que efectivamente, el efecto neuroprotector de la CsA se debe sólo y exclusivamente a la inhibición de la apertura de PPTM.



**Figura 42. FK 506 no altera la muerte inducida por OGD en neuronas corticales.** Neuronas corticales primarias sometidas al tratamiento OGD en combinación con FK506 a diferentes concentraciones. La administración del FK 506 se realizó una hora antes del tratamiento OGD. Las barras blancas indican que la incubación fue realizada en normoxia mientras que las barras negras señalan que los tratamientos fueron realizados en hipoxia (1% O<sub>2</sub>). La gráfica muestra media y S.E.M de 4 experimentos independientes.

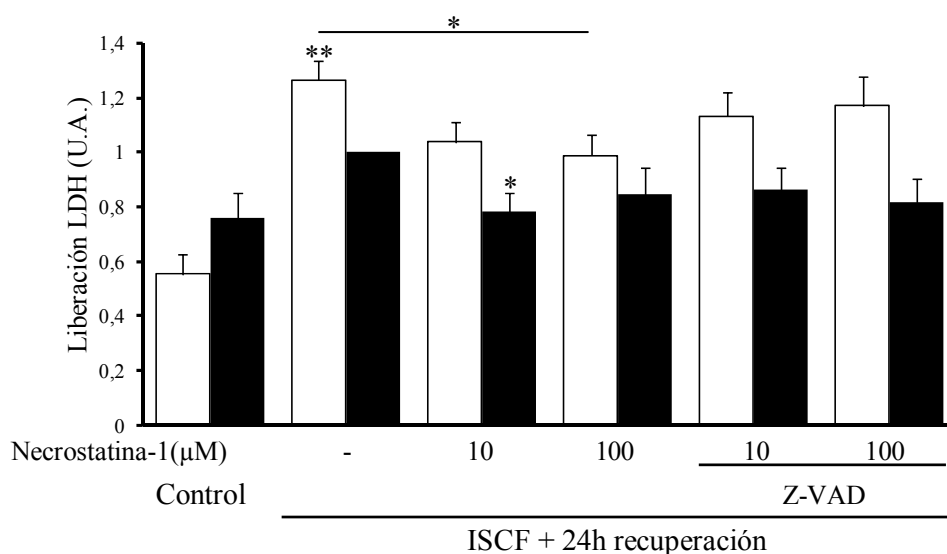
Por último, y a raíz del análisis de estos experimentos, comprobamos que las células tratadas con el vehículo de la CsA, el DMSO, las células morían sustancialmente menos que las células que no lo llevaban (Figura 43). Aunque llamativo, este fenómeno ha sido también observado mucho tiempo atrás (De la Torre and Surgeon, 1976). El dimetil sulfóxido (DMSO) es un agente antioxidante y se cree que pueda ayudar a bloquear los efectos perniciosos inducidos por los radicales libres del oxígeno. Es por este motivo por el que todos nuestros controles llevan el vehículo en el que está disuelta la droga a estudiar.



**Figura 43. DMSO protege las neuronas frente a OGD.** Medida de muerte en células tratadas con ICSF en combinación con DMSO. Las barras blancas indican normoxia y barras negras 1% O<sub>2</sub>. La gráfica muestra la media y S.E.M de 3 experimentos independientes.

### 11.2. En la muerte inducida por OGD/R también participa la necroptosis.

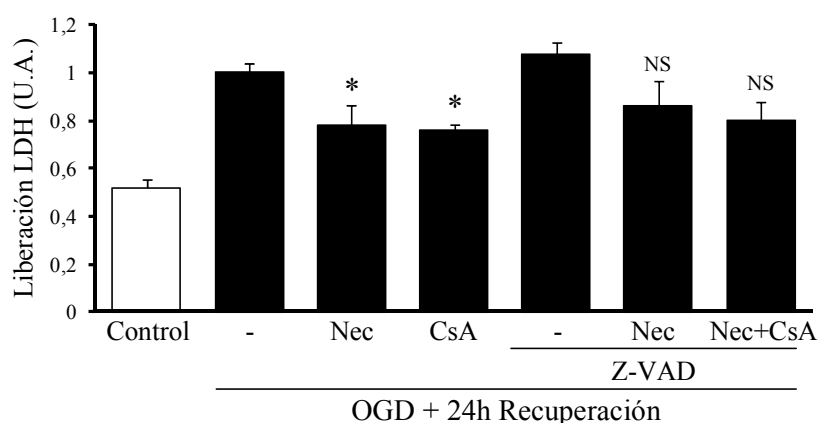
La protección inducida por la CsA (cercana a un 25%) podría dejar la puerta abierta a que hubiera otro tipo de mecanismo de muerte celular que esté interviniendo en la neurodegeneración por isquemia. Para conocer si parte de la población neuronal estaba muriendo por necroptosis, sometimos las células al tratamiento hipóxico en combinación con un inhibidor de RIPK1 llamado necrostatina-1. La necrostatina-1, administrada una hora antes del tratamiento isquémico, previene la muerte celular en torno a un 25% (Figura 44). La protección observada, tan similar a la obtenida con CsA, nos hizo plantearnos si parte de la población que no conseguimos proteger utilizando estas dos drogas estaba ahora muriendo por apoptosis. Realizamos también la combinación de ICSF, necrostatina-1 y Z-VAD para comprobar esta hipótesis. Como observamos en la figura 44, la tasa de muerte en las células tratadas con la triple combinación es prácticamente similar a las tratadas sólo con ICSF y necrostatina-1.



**Figura 44. Necrostatina-1 protege parcialmente frente a OGD.** Neuronas corticales tratadas en normoxia (barras blancas) e hipoxia al 1% O<sub>2</sub> (barras negras) con ICSF en combinación con dos concentraciones de necrostatina-1 y el inhibidor de caspasas Z-VAD. El tratamiento con ICSF se realizó durante 45 minutos tras los cuales se sometió de nuevo a las células al medio condicionado. La necrostatina-1 y el Z-VAD fueron administrados en todos los casos una hora antes que el ICSF, durante el tratamiento con ICSF y durante el periodo de recuperación en medio condicionado. Se muestran media y S.E.M. de al menos 4 experimentos independientes.

### 11.3. La protección de CsA y necrostatina-1 no son aditivas.

El hecho de que la necrostatina-1 y la CsA protegieran sólo de forma parcial a las neuronas de la muerte inducida por isquemia, nos hizo suponer que las células podrían estar empezando a morir como consecuencia de una vía de muerte celular programada diferente. Para comprobar si estábamos presenciando un viraje en el tipo de muerte celular cuando inhibíamos la apertura del poro mitocondrial o la necroptosis, realizamos combinaciones de CsA y necrostatina-1. La figura 45 nos muestra que la administración de CsA y necrostatina-1 protege frente al tratamiento OGD tanto como cada una de las ellas por separado. Por último, el bloqueo de la apoptosis (Z-VAD), la necroptosis (necrostatina-1) y la muerte por apertura del poro mitocondrial (CsA) de forma simultánea tampoco incrementa la viabilidad celular (Figura 45).

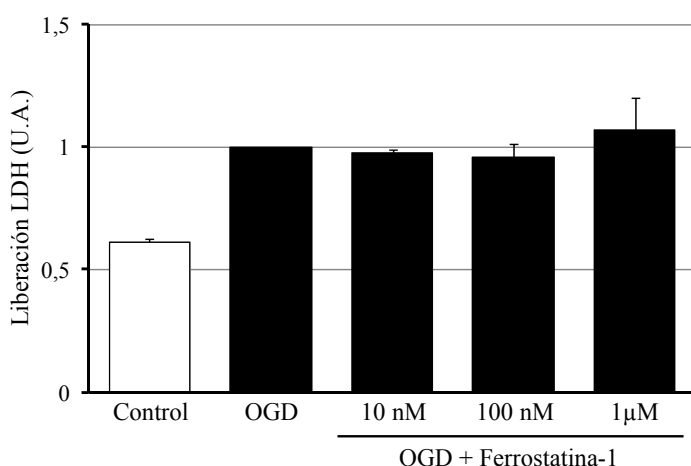


**Figura 45. Efecto de la combinación de necrostatina-1, ciclosporina A (CsA) y Z-VAD en OGD.** Neuronas primarias de ratón fueron tratadas durante 45 minutos mediante OGD en combinación con necrostatina-1 (Nec, 10  $\mu$ M), CsA (1  $\mu$ g/ml) y el inhibidor de caspasas Z-VAD (50  $\mu$ M) para medir la liberación de LDH tras 24 horas de recuperación en medio condicionado. Necrostatina-1, CsA y Z-VAD fueron administrados una hora antes del tratamiento OGD, durante el tratamiento OGD y durante las 24 horas de recuperación en medio condicionado. La figura representa la media y S.E.M de al menos 4 experimentos independientes.

#### 11.4. No hay evidencias de ferroptosis en nuestro modelo de OGD/R.

Se ha descrito en isquemia renal que la ferroptosis juega un papel fundamental en la degeneración del tejido tras sufrir isquemia. Además, se ha conseguido prevenir la muerte neuronal mediante el empleo de quelantes de hierro tanto *in vivo* como *in vitro* en isquemia cerebral (Ingrassia *et al.*, 2012) lo que nos induce a pensar que quizás la ferroptosis pueda tener un rol importante también en ictus.

Para comprobar si en el sistema nervioso también se produce este tipo de muerte celular, sometimos a las neuronas al tratamiento OGD en combinación con el inhibidor de la ferroptosis, ferrostatina-1. La combinación de esta droga con el tratamiento isquémico no altera la muerte celular inducida por el medio ICSF en hipoxia (Figura 46).



**Figura 46. La ferrostatina no altera la muerte inducida por OGD en neuronas corticales.** Neuronas corticales primarias sometidas al tratamiento OGD en combinación con ferrostatina-1 a diferentes concentraciones. La administración de la ferrostatina-1 se realizó una hora antes del tratamiento OGD. Las barras blancas indican que la incubación fue realizada en normoxia mientras que las barras negras señalan que los tratamientos fueron realizados en hipoxia (1% O<sub>2</sub>). La gráfica muestra media y S.E.M de 2 experimentos independientes.

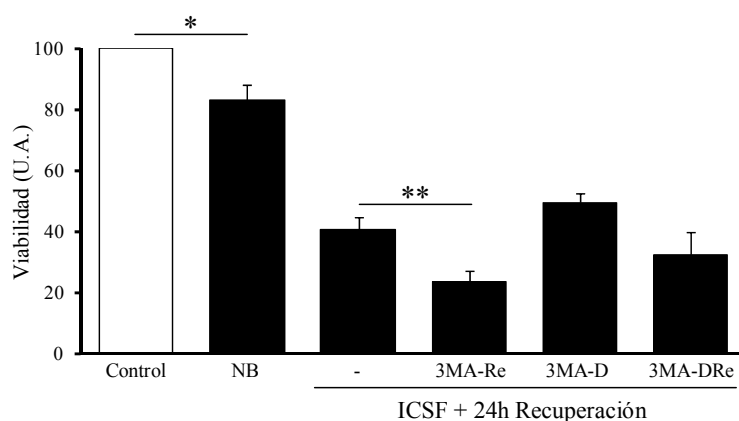
## 12. Respuesta ante la de falta de nutrientes.

### 12.1. Papel de la autofagia en OGD/R

El proceso de autofagia ha sido tenido en cuenta en relación a la isquemia debido a que se pensó que la autofagia podría ayudar a las células a combatir el estrés producido por la caída en los niveles de nutrientes y de ATP. Para conocer qué papel juega la autofagia en el modelo OGD/R, sometimos a las células a OGD/R en combinación con el inhibidor de autofagia 3-metiladenina (3MA) y medir la viabilidad celular en diferentes condiciones. Sorprendentemente, obtuvimos resultados completamente diferentes dependiendo de cuándo se suministrara la

3MA. La administración durante el periodo OGD parece proteger muy ligeramente, pero lo más llamativo es que su administración durante el periodo de recuperación reduce prácticamente a la mitad la viabilidad de las células sometidas al tratamiento isquémico (Figura 47). Una viabilidad intermedia presentan las células que son tratadas con 3MA durante la hipoxia y durante la recuperación.

Parece que nos encontramos ante un papel dual de la autofagia durante la hipoxia. Por una parte, durante el estrés agudo, las células mueren por autofágica (Zhang *et al.*, 2013), pero también podemos ver que durante la fase de recuperación en medio condicionado, el proceso autofágico no causa la muerte celular sino que la previene (Figura 47).

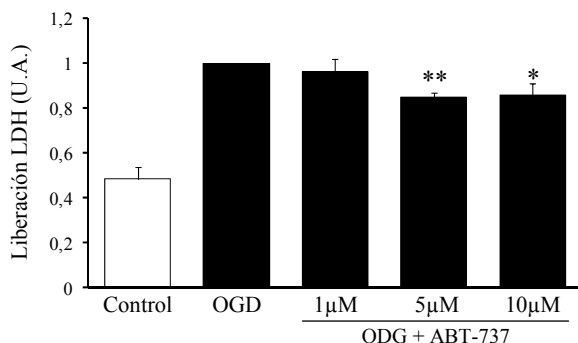


**Figura 47. La 3-metiladenina altera la muerte inducida por OGD.** Neuronas primarias de ratón en hipoxia al 1,5% O<sub>2</sub> (barras negras) con ICSF durante 45 minutos en combinación con 3MA (50 μM). La 3MA fue administrada durante OGD (3MA-D), durante OGD y la recuperación (3MA-DRe) y solamente durante el periodo de recuperación en medio condicionado (3MA-Re). Tras la recuperación, se midió la viabilidad celular utilizando el kit “Viability Assay” (Promega). NB: medio neurobasal. Las barras blancas indican que las neuronas fueron tratadas en normoxia. La gráfica muestra media y S.E.M de 3 experimentos independientes.

A esta misma conclusión llegaron Zhang *et al.*, utilizando tanto siRNA frente a Atg7 como ratones deficientes en Atg5, además de tratamientos con 3MA en ratones infartados (Zhang *et al.*, 2013).

Está ampliamente descrito que los miméticos de proteínas BH3-only son potentes inductores del proceso autofágico (Mizushima *et al.*, 2010). El mimético de proteína BH3-only, ABT-737, se puede unir y acomplejar a Bcl-2 propiciando por un lado que las proteínas BH3-only puedan actuar y activar a Bak y Bax. Pero la unión con Bcl-2 también puede significar la liberación de Beclina-1 y con ella, el aumento de la autofagia. Dado que la autofagia parece tener un papel protector, sometimos a las

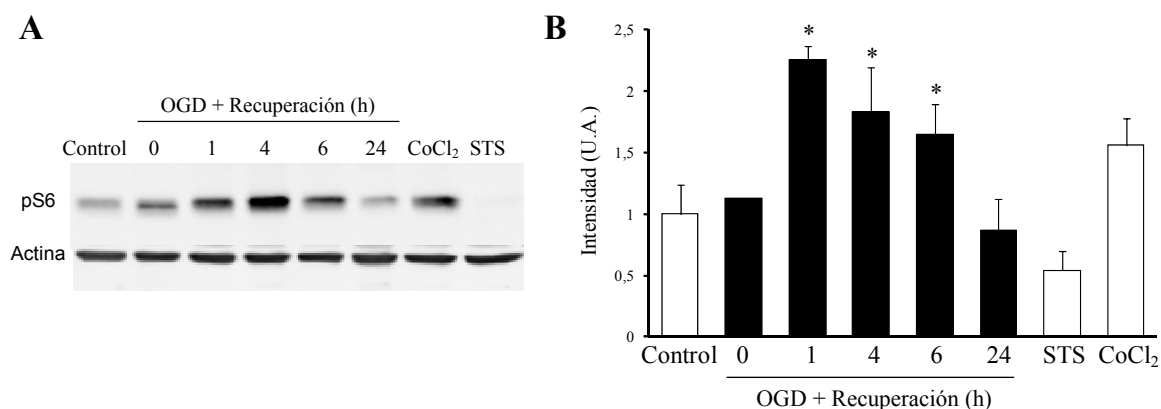
neuronas a OGD/R en combinación con ABT-737. Los resultados muestran que este compuesto puede proteger de forma significativa de los daños producidos por la isquemia (Figura 48).



**Figura 48. Efecto neuroprotector del ABT-737 frente a OGD.** Neuronas corticales primarias sometidas al tratamiento OGD en combinación con ABT-737 a diferentes concentraciones. La administración de ABT-737 se realizó una hora antes del tratamiento OGD. La barra blanca indica que la incubación fue realizada en normoxia mientras que las barras negras señalan que los tratamientos fueron realizados en hipoxia (1% O<sub>2</sub>). Se muestra la media y SEM de 4 experimentos independientes

## 12.2. Caracterización de la vía mTOR en OGD/R.

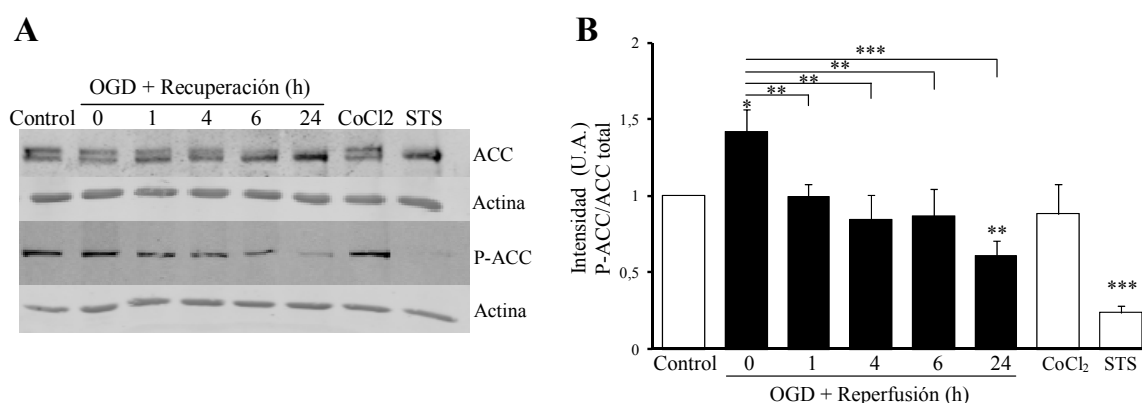
Con el fin de detallar el estado metabólico en el que se encuentra la célula, realizamos western blots de diferentes marcadores de la ruta de mTOR. Comprobamos el estado de fosforilación de la proteína ribosomal S6. Esta proteína es fosforilada por la acción de la proteína quinasa S6K, conocida diana de mTOR. La fosforilación de S6 indica que la síntesis de proteínas está activa, lo que de forma indirecta nos revela que mTOR también lo está. El tratamiento OGD en los cultivos primarios de neuronas de ratón provoca un aumento en la fosforilación de S6 a partir de la primera hora de recuperación en medio condicionado (Figura 49).



**Figura 49. S6 es rápidamente fosforilada tras el tratamiento OGD.** Neuronas primarias de ratón tratadas en hipoxia al 1,5% O<sub>2</sub> (barras negras) con ICSF durante 45 minutos y recuperación de distintos tiempos. Se trataron las células con STS (500 nM) y CoCl<sub>2</sub> (200 μM) durante 24 horas en normoxia (barras blancas) como inductor de muerte por apoptosis y como mimético químico de las condiciones de isquemia, respectivamente. **(A)** Imagen representativa de 8 experimentos independientes. **(B)** Se muestra la media y S.E.M. estos 8 experimentos.

Otros marcadores fundamentales para conocer el estado metabólico celular son las proteínas AMPK y ACC. AMPK detecta los niveles energéticos celulares, que cuando son bajos, fosforila (entre otros sustratos) a ACC, la cual es fundamental en la regulación del metabolismo de los ácidos grasos en la mitocondria a través de la  $\beta$ -oxidación. Cuando AMPK fosforila a ACC, ésta se inhibe y la  $\beta$ -oxidación se ve inducida.

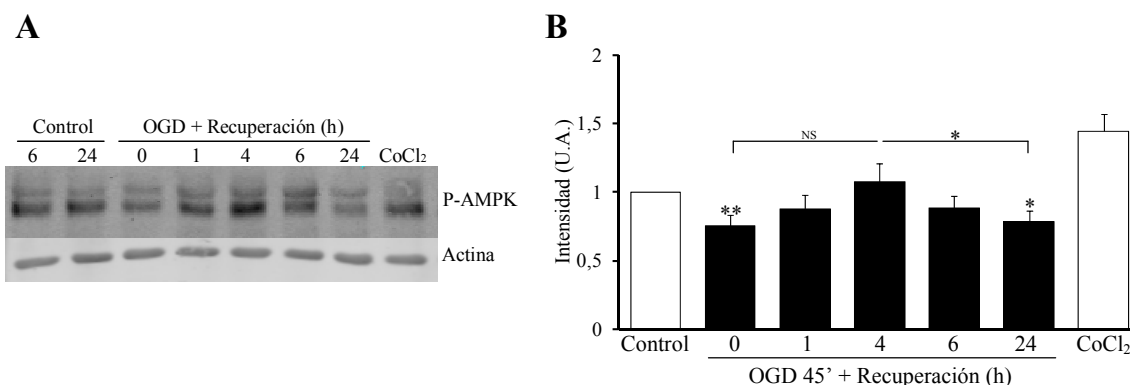
Tras el tratamiento OGD se induce significativamente la fosforilación de ACC, aunque rápidamente vuelven a sus valores normales (Figura 50). Además, como podemos observar en esa misma figura, los niveles de fosforilación de ACC, respecto a la proteína ACC total a las 24 horas del tratamiento, son sustancialmente menores que los control. Esto significa que la oxidación de ácidos grasos en la mitocondria es menor en las células tratadas.



**Figura 50. ACC es fosforilada rápidamente tras OGD y defosforilada 24 horas después del tratamiento.** Neuronas primarias de ratón tratadas en hipoxia al 1,5% O<sub>2</sub> (barras negras) con ICSF durante 45 minutos y recuperación de distintos tiempos. Se trataron también con STS (500 nM) y CoCl<sub>2</sub> (200  $\mu$ M) durante 24 horas en normoxia (barras blancas) como inductor de muerte por apoptosis y como mimético químico de las condiciones de isquemia, respectivamente. La gráfica muestra la media y S.E.M. de 10 experimentos independientes.

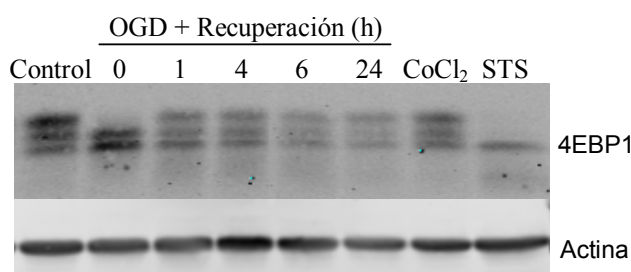
Por su parte, AMPK es defosforilada rápidamente tras el tratamiento y durante la recuperación, vuelve lentamente a ser fosforilada hasta llegar a un máximo a las 4 horas postratamiento. A partir de este momento vuelve a defosforilarse hasta llegar a niveles menores que los basales a las 24 horas de recuperación (Figura 51)





**Figura 51. AMPK es defosforilada tras OGD.** Neuronas primarias de ratón tratadas en hipoxia al 1,5% O<sub>2</sub> (barras negras) con ICSF durante 45 minutos y recuperación de distintos tiempos. Se trataron también con CoCl<sub>2</sub> (200  $\mu$ M) durante 24 horas en normoxia (barras blancas) como mimético químico de las condiciones de isquemia. La gráfica muestra la media y S.E.M. de 11 experimentos independientes.

Comprobamos también el patrón de fosforilación de la proteína 4EBP1 tras el tratamiento isquémico. La fosforilación de esta proteína por parte de mTOR produce la liberación de eIF<sub>4</sub>E y el comienzo de la síntesis de proteínas. Como se observa claramente en la figura 52, justamente tras el tratamiento se produce una fuerte defosforilación de la proteína. 4EBP1 es rápidamente refosforilada ya que en menos de una hora se vuelven a apreciar las bandas de fosforilación de esta molécula.

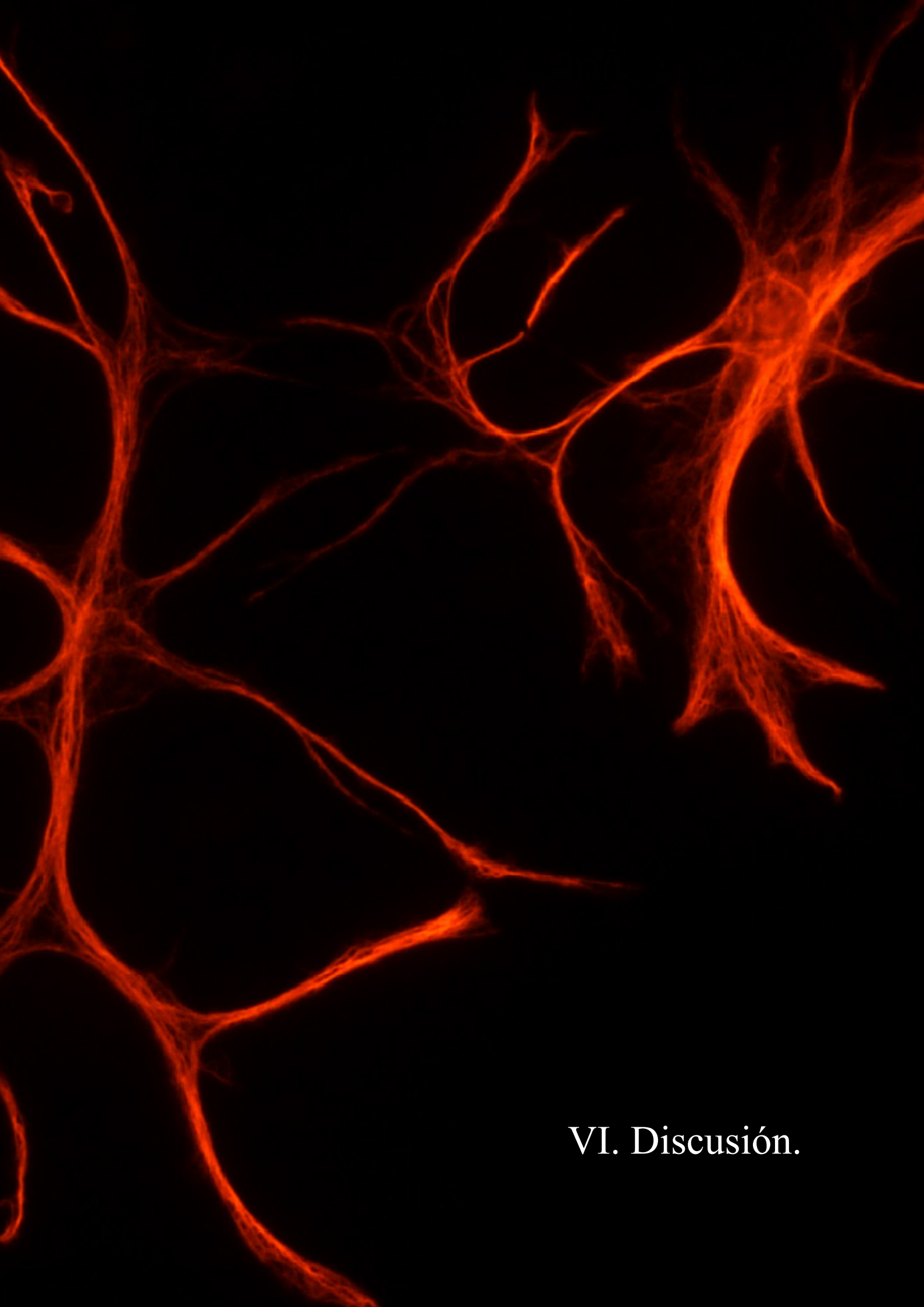


**Figura 52. Cambio de patrón en la fosforilación de 4EBP1 tras OGD.** Neuronas primarias de ratón tratadas en hipoxia al 1,5% O<sub>2</sub> con ICSF durante 45 minutos y recuperación de distintos tiempos. Se trataron también con STS (500 nM) y CoCl<sub>2</sub> (200  $\mu$ M) durante 24 horas en normoxia como inductor de muerte por apoptosis y como mimético químico de las condiciones de isquemia, respectivamente.

Los marcadores moleculares parecen indicar que durante el periodo en el que las células están siendo sometidas al tratamiento con OGD, AMPK se activa y fosforila a ACC y probablemente también a mTOR inhibiendo su actividad (lo que queda reflejado claramente en las figuras 49 y 52). Esta inhibición de mTOR es muy poco duradera ya que pasada la primera hora de recuperación en medio condicionado, los marcadores de la actividad quinasa de mTOR indican que éste está activo.







## VI. Discusión.



## Apolipoproteína L2 como posible proteína BH3-only

### Domino BH3.

Las proteínas de la familia Bcl-2 están ampliamente distribuidas filogenéticamente hablando, desde poríferos hasta mamíferos. Los miembros de la familia se cree que han ido apareciendo gracias a las duplicaciones y a la ganancia de función a lo largo de la evolución. En las últimas ramas de la evolución, concretamente en los primates, probablemente el procesamiento alternativo y las modificaciones postranscripcionales (como por ejemplo, fosforilación y corte de proteínas) han podido contribuir al aumento en la variabilidad y la multifuncionalidad de los miembros de esta familia (Aouacheria *et al.*, 2005).

Las proteínas BH3-only no comparten un alto grado de homología entre ellas, y es posible que el dominio BH3 surgiese, o aleatoriamente durante la evolución, o por un proceso de evolución convergente. Además, el dominio BH3 no está muy fuertemente conservado entre las proteínas de la familia Bcl-2, lo que nos hace pensar que probablemente, este dominio contenga solamente algunos residuos fundamentales para su correcto funcionamiento o que en multitud de las proteínas que lo contienen no se encuentra funcional. Tan baja es la homología de las secuencias de los dominios BH3, que algunos de los miembros de las proteínas BH3-only han sido encontrados gracias a su fenotipo proapoptótico y no por su homología estructural (Kaczmarek *et al.*, 2011).

Este proyecto comenzó con una exhaustiva búsqueda, basada en una secuencia consenso que generamos a partir del alineamiento con múltiples secuencias proteicas de mamíferos que contienen el dominio BH3. Esta búsqueda dio como resultado la identificación de todas las proteínas BH3-only conocidas en humano, además de cinco nuevos posibles candidatos a ser proteínas BH3-only (Tabla 8).

Nuestro cribado identificó la proteína PXT1, la cual contiene un dominio similar al BH3. Esta proteína ha sido descrita como inductora de la liberación de citocromo c y de apoptosis en HeLa de forma dependiente del dominio BH3 (Kaczmarek *et al.*, 2011). Las enzimas fenilalanina hidroxilasa y fucosiltransferasa, también surgieron

como candidatas a ser proteínas BH3-only aunque fueron rápidamente descartadas debido a que estaban bien caracterizadas y tenían funciones alejadas de las de las proteínas BH3-only. El hecho de que estas dos proteínas tengan una alta homología con el dominio pero este no confiera las características típicas de las BH3-only nos refuerza la idea de que probablemente haga falta algo más que tener el motivo BH3 en la estructura proteica. Aun en el caso de que estas dos enzimas pudieran tener funciones secundarias aun no descritas como proteínas BH3-only, el objetivo de este cribado era el de encontrar una proteína cuya función principal estuviera relacionada con las proteínas BH3-only.

Uno de los 5 candidatos que se obtuvieron con el análisis bioinformático era realmente grande: 834 residuos. Las proteínas BH3-only son en su mayoría proteínas de bajo peso molecular (Bad 23 kDa, Bid 18-23 kDa, Noxa 16 kDa) por lo que una proteína de unos 85-90 kDa como ésta, parece poco probable que comparta funcionalidad con las anteriormente citadas. Probablemente este sea otra característica que han de presentar las proteínas con el dominio BH3 para ser funcionalmente similares a las BH3-only.

### **Apolipoproteínas L y muerte celular.**

Teniendo en cuenta todo lo anterior, ApoL2 parecía la candidata perfecta ya que su bajo peso molecular (quizás algunos aminoácidos por encima de la media de las BH3-only), su condición de proteína prácticamente desconocida en cuanto a función se refiere y el ser miembro de la familia de las apolipoproteínas L nos hizo elegirla como nuestro objeto de estudio.

ApoL1, el miembro fundador de la familia, fue identificada como uno de los componentes de las partículas HDL de la sangre (Duchateau *et al.*, 2001). En los siguientes años, se han descrito algunas proteínas homólogas que ahora forman la familia de las apolipoproteínas L, que consta de seis miembros en humanos y 8-14 en roedores (Monajemi *et al.*, 2002; Page *et al.*, 2001).

ApoL1 es el único miembro de la familia que se cree que pueda ser secretado, debido a que es el único que presenta el péptido señal en su secuencia. Cuando ApoL1 es internalizada por los tripanosomas, genera poros en su membrana

lisosomal (Perez-Morga *et al.*, 2005) provocando la destrucción del parásito. ApoL1 y ApoL6 son capaces de matar también células mamíferas cuando son sobreexpresadas (Liu *et al.*, 2005), y ha sido propuesto que todos los miembros de la familia pueden compartir esta habilidad (Vanhollebeke and Pays, 2006). La capacidad de ApoL1 y ApoL6 para inducir muerte celular puede ser bloqueada si se elimina el motivo BH3 de la proteína (Liu *et al.*, 2005; Wan *et al.*, 2008).

### **Rol antiapoptótico de ApoL2.**

Hemos visto que ApoL2 se presenta como una proteína ubicua y con una localización celular poco definida. No se encuentra en el núcleo sino en el citoplasma, con una distribución más o menos homogénea, aunque se ha descrito que se trasloca a la mitocondria en condición de infección por virus (Wu *et al.*, 2013).

Liao *et al.*, atribuyeron un papel antiapoptótico a ApoL2 en su modelo de células broncoepiteliales primarias tratadas con interferón gamma (Liao *et al.*, 2011). En nuestro modelo, aunque ApoL2 es inducida tras el tratamiento con interferón, no hemos observado este rol protector (Figura 21). Es probable que esta función antiapoptótica de ApoL2 sea dependiente del tipo celular.

Ha sido descrito que las proteínas de la familia de las apolipoproteínas L son inducidas en situación de infección (Hayashi *et al.*, 2005; Stojdl *et al.*, 2003). Recientemente se ha comprobado que, efectivamente, ApoL2 es inducida levemente en las células de la línea A539 cuando son infectadas por el virus H3N2 y, además, que ésta es traslocada desde el citosol a la mitocondria (Wu *et al.*, 2013).

Las infecciones víricas pueden inducir el promotor IRF3 a través de la ruta de NF- $\kappa$ B, por lo que podría ser que ambas inducciones de ApoL2 descritas hasta la fecha se produzcan a través del mismo estímulo molecular. Por tanto, el papel antiapoptótico otorgado por Liao *et al.*, podría deberse a que esta proteína cumple una función en la defensa celular frente a ciertas señales que involucran a la mitocondria. Lamentablemente, aunque nosotros hemos tratado con una gran variedad de estímulos de muerte celular, no hemos podido encontrar el estímulo necesario para observar un posible efecto de esta proteína en HeLa (Figura 24). La



única característica antiapoptótica que hemos detectado en ApoL2 es su capacidad para disminuir la muerte basal al ser sobreexpresada en HeLa (Figura 23), para la cual no tenemos explicación.

Estos dos hechos, junto con la descripción de otras proteínas de la familia de las apolipoproteínas L como proteínas BH3-only, y la evidencia de que esta proteína se encuentra inducida en ciertos tipos de tumores (Figura 18, Liao *et al.*, 2011), nos lleva a pensar que ApoL2 tiene un rol en apoptosis que puede ser dependiente del tipo celular y del estímulo.

Es posible que el residuo de ácido aspártico que se sitúa en la posición 10 del dominio BH3 (Figura 17) sea esencial para su función antiapoptótica. La función de otras proteínas de la familia Bcl-2 que tienen un residuo de ácido glutámico en dicha posición, como son Bcl-Rambo (Bcl2L13) y Bcl-G (Bcl2L14), aún no está definida por completo, pero parece estar relacionada con la muerte celular (Giam *et al.*; Tischner and Villunger).

### **ApoL2 interacciona débilmente con Bcl-2**

Hemos observado una débil interacción de ApoL2 con la proteína antiapoptótica Bcl-2. La interacción entre ambas proteínas podría realizarse mediante el dominio que ambas proteínas comparten, el dominio BH3. Aunque prácticamente todas las proteínas de esta familia contienen este dominio, las diferencias en las secuencias provocan la existencia de diferentes afinidades entre los miembros de la familia. Por eso, el hecho de que sólo hayamos detectado interacción con Bcl-2 (y no con otras proteínas relacionadas) no implica que la interacción no pueda producirse a través de esta región estructural.

A pesar de saber que ApoL2 y Bcl-2 interaccionan, aún no hemos esclarecido la funcionalidad de esta unión. No hemos obtenido diferencias en los valores de muerte por apoptosis inducida por varios estímulos cuando ApoL2 está silenciada. El uso del mimético de proteína BH3-only, ABT-737, tampoco reveló nueva información sobre este asunto. ABT-737 es capaz de unirse y bloquear a las proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2, por lo que podría actuar como inhibidor competitivo en la unión de Bcl-2 con ApoL2. El tratamiento con este fármaco en

células sin ApoL2 podría revelar un cambio en la tasa de muerte debido a que al no tener ApoL2, estas células tendrían mayor proporción de Bcl-2 libre para proteger frente a la citotoxicidad del ABT-737.

### **Posible papel de ApoL2 en autofagia.**

ApoL1 y ApoL6 tienen la capacidad de unirse a lípidos (Liu *et al.*, 2005; Wan *et al.*, 2008). ApoL6 se une a Bcl-xL y regula la autofagia (Zhaorigetu *et al.*, 2011) de forma parecida a cómo Beclina-1 se une a Bcl-2 con el mismo fin. Parece ser que existen muchas similitudes entre algunos miembros de la familia de apolipoproteínas L y los miembros más comunes de la familia de Bcl-2.

Nosotros hemos constatado que el silenciamiento de esta proteína provoca una disminución de los niveles basales de p62, lo que podría sugerir que ApoL2 regula la autofagia bajo ciertas condiciones. Podría ser que ApoL2 module la autofagia basal de forma negativa. Nuestra posible explicación para esta regulación negativa sería que ApoL2 intervenga de alguna manera en la unión inhibidora de Bcl-2 con Beclina-1. No obstante, las evidencias que sugieren que ApoL2 regula la autofagia basal son pocas y son necesarios nuevos experimentos para poder concluir dicho efecto.

### **Isquemia cerebral en la actualidad.**

La OMS estima que en 2050 la población mayor de 65 años será mayor del 45% del total y que casi la mitad podría sufrir un accidente cerebrovascular. Se trata de un problema de salud mundial y en el que aún no se han conseguido grandes avances. Hoy en día el tratamiento frente a un episodio de esta índole es la administración de sustancias trombolíticas como el tPA o el uso de dispositivos de eliminación del tapón como TREVO, Merci y Solitaire. No obstante, aún no existen tratamientos efectivos dirigidos de forma precisa a las vías de señalización que inducen la muerte neuronal durante el periodo de reperfusión cerebral. A decir verdad, el primer motivo por el que aún no existe un tratamiento de estas características podría ser la falta de acuerdo en el tipo de muerte que se produce en el SNC cuando sufre un ictus.

### **Papel de las proteínas Bcl-2 en isquemia.**

Probablemente uno de los puntos donde más datos contradictorios podemos encontrar en la bibliografía es la descripción de la apoptosis en este modelo. Por una parte, numerosos autores han descrito parcialmente el papel de la apoptosis en la neurodegeneración inducida por isquemia. En este sentido, se ha descrito que la activación de las caspasas que es crucial en este fenómeno (Badiola *et al.*, 2011), puede ser debida a la activación del receptor de TNF. Dado que las caspasas 3, 8 y 9 están propiciando la muerte en algunos modelos (Malagelada *et al.*, 2005), los inhibidores de estas proteasas aumentan la viabilidad neuronal (Fink *et al.*, 1998). También se ha aumentado la viabilidad suprimiendo las proteínas BH3-only que puedan estar iniciando la cascada (Plesnila *et al.*, 2002) y aumentando las proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2 (Cao *et al.*, 2002).

En nuestro caso (y en el de otros autores), hemos descrito un complejo sistema neurodegenerativo en el que no hay activación de caspasas ni de PARP (Figura 37), ni aparición de los núcleos picnóticos característicos de la apoptosis (Figura 35). También tratamos de disminuir la muerte utilizando inhibidores de caspasas aunque sin éxito ninguno (Figura 35). Gill *et al.*, tampoco consiguieron ver activación de

caspasa 3, liberación de citocromo c ni protección con inhibidores de caspasas (Gill *et al.*, 2002).

En nuestro caso, hemos caracterizado la inducción de una proteína de la familia Bcl-2 que tiene un papel claramente proapoptótico, como es la proteína BH3-only Noxa. La inducción del mensajero (Figura 30) y de la proteína (Figura 32), nos hacía sospechar que quizás Noxa fuese responsable de la muerte inducida por el tratamiento OGD. El silenciamiento de Noxa, efectivamente, nos muestra (Figura 33) que Noxa está involucrado en la citotoxicidad inducida por este estrés tan característico. No obstante, no hemos podido dar evidencias de la ruta de señalización ni de ejecución en la que participa. Noxa ha sido descrita como una de las proteínas clave en la respuesta frente al estrés metabólico y de retirada de nutrientes (Wensveen *et al.*, 2011, Lowman *et al.*, 2010). Otra proteína de la familia descrita como implicada en la muerte por isquemia es Bmf. Bmf está inducida tras OGD (Figura 30) y el ratón deficiente en esta proteína tiene un volumen menor de tejido infartado tras la simulación isquémica mediante la oclusión temporal de la arteria cerebral central. Por el contrario, el ratón deficiente en Noxa, parece no tener efectos neuroprotectores frente a los WT. Todo esto lo hemos descrito en colaboración con el laboratorio de Jochen Prehn (Pfeiffer *et al.*, 2014).

A la luz de estos datos, necesitábamos encontrar cómo dos proteínas BH3-only inducen la muerte de las neuronas si no es a través de apoptosis. La inducción de Bax tras la isquemia *in vivo* fue descrito primero por (Krajewski *et al.*, 1995) y ahora por (D'Orsi *et al.*, 2015), demostrando que Bax juega un papel muy importante en la muerte por isquemia. Este último trabajo ahonda en la idea de que la muerte es debida a un fenómeno multifactorial en el que sólo una parte de la muerte (alrededor de un 30%) es inducida por la excitotoxicidad. Muestran también que los ratones deficientes en Bax tienen un volumen de tejido infartado de la mitad que los WT, pero la vía de señalización aún sigue sin conocerse. Además, algunos trabajos ya mencionados describen que la sobreexpresión de Bcl-2 protege las neuronas frente a la isquemia, quizá acomplejando a Bax y evitando la formación del poro.

La activación de Bax podría deberse (o no) a una activación de la apoptosis, pero algunas peculiaridades. Nuestra hipótesis en cuanto a la activación de Bax es que las

proteínas BH3-only son inducidas tras la isquemia (Figura 30) y estas son las encargadas de activar a Bax. Al no observar corte de caspasa 3 ni de PARP, la muerte creemos que podría ser muerte celular independiente de caspasas. No obstante, haría falta realizar los experimentos pertinentes para poder comprobar si esta hipótesis tiene algo de cierto.

En este sentido, y gracias a las últimas investigaciones en el campo de la muerte celular, hoy tenemos un mayor conocimiento de posibles cruces entre vías de señalización que hace unos años no se planteaba siquiera.

### **Papel del poro de permeabilidad transitoria de la membrana**

En los últimos diez años, el papel del PPTM ha sido ampliamente estudiado y en concreto, su papel en la neurodegeneración inducida por la falta de nutrientes y oxígeno. Se ha comprobado que la inhibición de la apertura del poro previene parcialmente *in vitro* (Figura 41, Yu *et al.*, 2013) e *in vivo* (Borlongan *et al.*, 2005) los daños por este tratamiento. Además, se ha determinado muy parcialmente ciertos aspectos del mecanismo de acción de esta apertura, como por ejemplo ésta se produce tras la unión entre la proteína CpD y la proteína p53 (Vaseva *et al.*, 2012).

La inhibición de la apertura del PPTM con la administración de la CsA ha sido ensayada clínicamente con éxito en pacientes con infarto de miocardio (Piot *et al.*, 2008). La CsA era administrada al comienzo de la fase de reperfusión y lo antes que fuese posible. En el modelo de isquemia cerebral, una de las características que tiene la CsA, es que sólo es efectiva si se administra una hora antes (al menos) del tratamiento isquémico (Figura 41, Cho *et al.*, 2013).

Esto es un problema importante para poder llevar este fármaco a ensayos clínicos para pacientes que han sufrido un ictus, ya que la CsA no atraviesa (o atraviesa muy poco) la barrera hematoencefálica, por lo que su administración horas antes de la isquemia parece no ser viable (dejando a un lado el hecho de que el ictus es un fenómeno fortuito que no se puede predecir).

### **Contribución de la necroptosis a la muerte inducida por la isquemia.**

Especialmente interesante nos resulta la posibilidad de que la ruta apoptótica, en los modelos en los que se ha descrito pueda estar siendo a través de la activación de un receptor de muerte y de la caspasa 8 (Badiola *et al.*, 2009; Felderhoff-Mueser *et al.*, 2000; Martin-Villalba *et al.*, 1999). Por nuestra parte, datos preliminares de nuestro laboratorio no revelaron inducción del mensajero de TNFR ni tampoco la citoquina en el medio extracelular (datos no mostrados).

Está de candente actualidad la muerte mediante necroptosis y se ha comprobado que el bloqueo de esta ruta protege las neuronas de la muerte por isquemia (Degterev *et al.*, 2005) y por excitotoxicidad (Li *et al.*, 2008b). Nosotros hemos utilizado el inhibidor de RIPK1 para comprobar que en nuestro modelo, la inhibición de la necroptosis protege parcialmente las neuronas tras OGD/R.

Hasta la fecha, las investigaciones llevadas a cabo en el ámbito de la necroptosis son unánimes al afirmar que para que ésta tenga lugar, la actividad proteasa de la caspasa 8 ha de estar de alguna manera truncada. Esta característica ha sido atribuido por cierta parte de la comunidad científica como una forma de resistir a ciertas infecciones en donde el patógeno induce la síntesis de inhibidores de caspasas. Pero, ¿qué inhibe la caspasa 8 en nuestro modelo? Si la señal recibida por las células tras I/R es a través de un receptor de muerte como TNF, ¿cómo podría ser que encontremos diferentes tipos de muerte celular aún con el mismo tipo de estímulo? ¿Se están activando rutas completamente diferentes en las células, o es que la vía de señalización activada tiene ramas alternativas que finalizan en tipos de muerte celular diferentes? Nuestra hipótesis para estas incógnitas estaría basada en una cuestión de balances y de concentraciones. Podría ser que la inhibición de la necroptosis ejercida por el complejo TRADD-FLIP-Caspasa 8 no fuese similar en todas las células antes de que el estímulo de TNF llegue a la célula. Así, las neuronas con menor proporción de este complejo podrían no ser suficientes para bloquear la necroptosis. Por otro lado, en las células con niveles altos de este complejo, podríamos encontrar (y muchos autores lo hacen) evidencias de apoptosis inducida por TNF. No obstante, esta explicación parece no encajar del todo con los

experimentos en los que se bloquean la acción de las caspasas a la vez que la necroptosis y los niveles de muerte no se reducen (Figuras 44 y 45).

Por último, habría que tener en cuenta la posibilidad de que la protección proporcionada por la CsA podría estar produciéndose a través de la misma vía que la protección con necrostatina-1. El hecho de que ambos cotratamientos reduzcan muerte inducida por OGD/R en la misma proporción nos hizo pensar que podrían estar protegiendo del mismo tipo de muerte, y que el resto de la población que no conseguíamos recuperar, mueren por otro tipo. La figura 41 nos confirma que la combinación de ambas drogas no aumenta la protección aportada por cada una de ellas, lo cual sugiere que las dos están protegiendo la misma población de células. Esta apreciación ya había sido descrita para células de corazón (Lim *et al.*, 2007). Al hilo del párrafo anterior, el tratamiento combinado con inhibidores de apoptosis, de necroptosis y de la apertura del PPTM, no revela ningún cambio significativo ni en cuanto a valores de muerte celular ni morfología. Esto nos lleva a pensar que al CsA y necrostatina-1 están inhibiendo el mismo tipo de muerte, o al menos que estamos inhibiendo la misma población. Además, también nos refuerza la idea de que en nuestro modelo no hay apoptosis.

No obstante, solamente hemos utilizado un tipo de experimento para estudiar la necroptosis. Nos hubiera gustado utilizar siRNA para silenciar o una droga para inhibir alguna otra proteína clave de la necroptosis

### **Papel del calcio.**

El aumento de calcio intracelular se ha postulado como uno de los principales motivos por el que se desatan las cascadas bioquímicas que condenan a las neuronas a su muerte. Entre los efectos producidos por el calcio se encuentra la excitotoxicidad, la descompensación del potencial de membrana, el aumento de ROS, pero existe además una vía específica de señalización a través del aumento del calcio que induce la muerte celular. Cuando aumenta este ión en la célula, las calpaínas (proteasas dependientes de calcio) pueden ser activadas, cortar a Bid e inducir muerte apoptótica por la vía mitocondrial. También se ha descrito que el aumento de las calpaínas puede inducir la acción de la fosfatasa calcineurina

(Broughton *et al.*, 2009; Burkard *et al.*, 2005; Lee *et al.*). En este sentido, algunos autores han demostrado que alterar la vía de señalización del calcio, mediante el inhibidor de la calcineurina, protege frente a la isquemia focal (Kuroda and Siesjö, 1996; Sharkey and Butcher, 1994). En nuestro modelo, en el que no hemos encontrado ningún signo de activación apoptótica, la combinación de esta droga con el tratamiento OGD no ha producido ninguna alteración en los niveles de muerte celular (Figura 42). Lo que podría indicar que esta ruta de señalización no es crítica para la viabilidad neuronal en nuestro modelo.

### **Papel de los receptores de glutamato y de los ROS en isquemia.**

Uno de los principales focos de investigación en relación con los efectos neurodegenerativos ha sido el papel de los receptores ionotrópicos regulados por glutamato. Estos canales han sido descritos como uno de los principales factores que interviene en la excitotoxicidad y en el aumento de calcio intracelular. No es de extrañar que los inhibidores de estos canales hayan sido probados en multitud de ensayos clínicos y todos con resultados desalentadores (Albers *et al.*, 1999; Davis *et al.*, 2000; Sacco *et al.*, 2001). Después de generaciones de inhibidores de los receptores NMDA, parece que la estrategia debe ser otra. Se ha descubierto que los receptores NMDA tienen un papel dual en la respuesta isquémica: los receptores con la subunidad GluN2B (zona sináptica y extrasináptica), inducen excitotoxicidad y muerte neuronal, mientras que la activación de los NR2A (zona sináptica) tiene un papel neuroprotector. La inhibición generalizada mediante el uso de bloqueadores de estos receptores no ha sido fructífera probablemente debido a la inhibición de la señal pro supervivencia a través de los receptores NR2A (Broughton *et al.*, 2009; Ikonomidou and Turski, 2002).

La excitotoxicidad, la caída de los niveles energéticos y varios factores más provocados por la isquemia inducen un aumento significativo de ROS dentro de la célula. Estos ROS han sido descritos como una de las piezas clave en la muerte neuronal durante la reperusión y es por ello que se han realizado diversos ensayos clínicos con agentes antioxidantes con el fin de reducir la cantidad de estos agentes tóxicos (Amaro *et al.*, 2011; Kaste *et al.*, 2013; Lees *et al.*, 2006; Shinohara *et al.*, 2009).



En nuestro trabajo no hemos abordado el papel de la citotoxicidad de los radicales libres, pero accidentalmente hemos comprobado que el uso (aunque en pequeñas cantidades) del antioxidante DMSO, puede proteger nuestros cultivos celulares sometidos al tratamiento OGD/R (Figura 43). Para nuestra sorpresa, este fenómeno neuroprotector ya ha sido descrito no sólo *in vitro* sino también *in vivo* como un posible agente neuroprotector frente a la isquemia (De la Torre and Surgeon, 1976; Yang *et al.*, 2008). Bien es cierto que hay voces discrepantes en cuanto al papel neuroprotector de compuesto (Little *et al.*, 1983). Más allá del posible efecto neuroprotector del DMSO, habría que recalcar que estos resultados nos obligan a ser rigurosos a la hora de realizar experimentos con los controles necesarios, ya que es muy habitual el uso de este compuesto para disolver compuestos que son distribuidos en polvo. Este es el motivo por el que en nuestros experimentos con compuestos disueltos en DMSO, todas las condiciones del experimento en las que no se administra la droga, se administra DMSO.

### **Papel de la autofagia mTOR en la neurodegeneración asociada a la isquemia/reperfusión.**

En los últimos años, el estudio de la respuesta celular frente a la retirada de nutrientes ha sido de especial relevancia en el ámbito de la isquemia cerebral. Se ha descrito que en células que han sufrido este estímulo tienen niveles de autofagia más altos que los basales (Gu *et al.*, 2013). Zhang y colaboradores describieron que la autofagia juega un papel dual y fundamental en la respuesta de las neuronas frente al estrés postisquémico. Esta dualidad está reflejada en el hecho de que durante el periodo de isquemia la autofagia es de tal magnitud que mata las células. Esta muerte es debida a la autofagia, ya que su inhibición previene la muerte celular (Zhang *et al.*, 2013). Por el contrario, durante la fase de reperfusión, la autofagia parece que proporciona a las células una vía de recuperación y su inhibición en esta fase resulta deletérea (Zhang *et al.*, 2013). Además, el tratamiento con rapamicina (inhibidor de mTOR e inductor de autofagia) ha sido probado como neuroprotector tanto *in vitro* (Fletcher *et al.*, 2013) como *in vivo* (Chauhan *et al.*, 2011).

### **Dianas combinadas**

Dado que nos enfrentamos a un complejo sistema de neurodegeneración inducida por la isquemia en el que tienen lugar diversos tipos de muerte celular, parece acertado intentar paliar estos efectos con tratamientos combinatorios de diferentes drogas. Algunos estudios al respecto han sido realizados con esta estrategia, como por ejemplo (Xu *et al.*, 2010) que combinaron la necrostatina-1 con un inhibidor de apoptosis obteniendo un incremento en la protección. Otro ejemplo de combinación de tratamientos similar, es la descrita por Yuen *et al.*, quienes realizaron tratamientos combinando CsA con eritropoyetina (que según (Siren *et al.*, 2001) es capaz de proteger frente a isquemia) observando que la combinación de ambas drogas ofrecían una protección mayor que por separado. También se ha ensayado la CsA en combinación con postcondicionamiento. El postcondicionamiento hace referencia a la inducción de nuevos estímulos isquémicos de menor intensidad tras el tratamiento isquémico. Esta combinación de CsA con postcondicionamiento, resulta tener un efecto neuroprotector mucho mayor en ratas (Sun *et al.*, 2012).

Fan *et al.*, realizaron un postcondicionamiento basado en la administración de aire con hasta un 30% de CO<sub>2</sub> con el fin de inducir acidosis en los ratones afectados por el tratamiento isquémico. Con esta estrategia consiguieron reducir a la mitad el volumen infartado. Este tratamiento podría ser también utilizado en combinación con otros tratamientos farmacológicos para disminuir aún más las consecuencias de la isquemia.

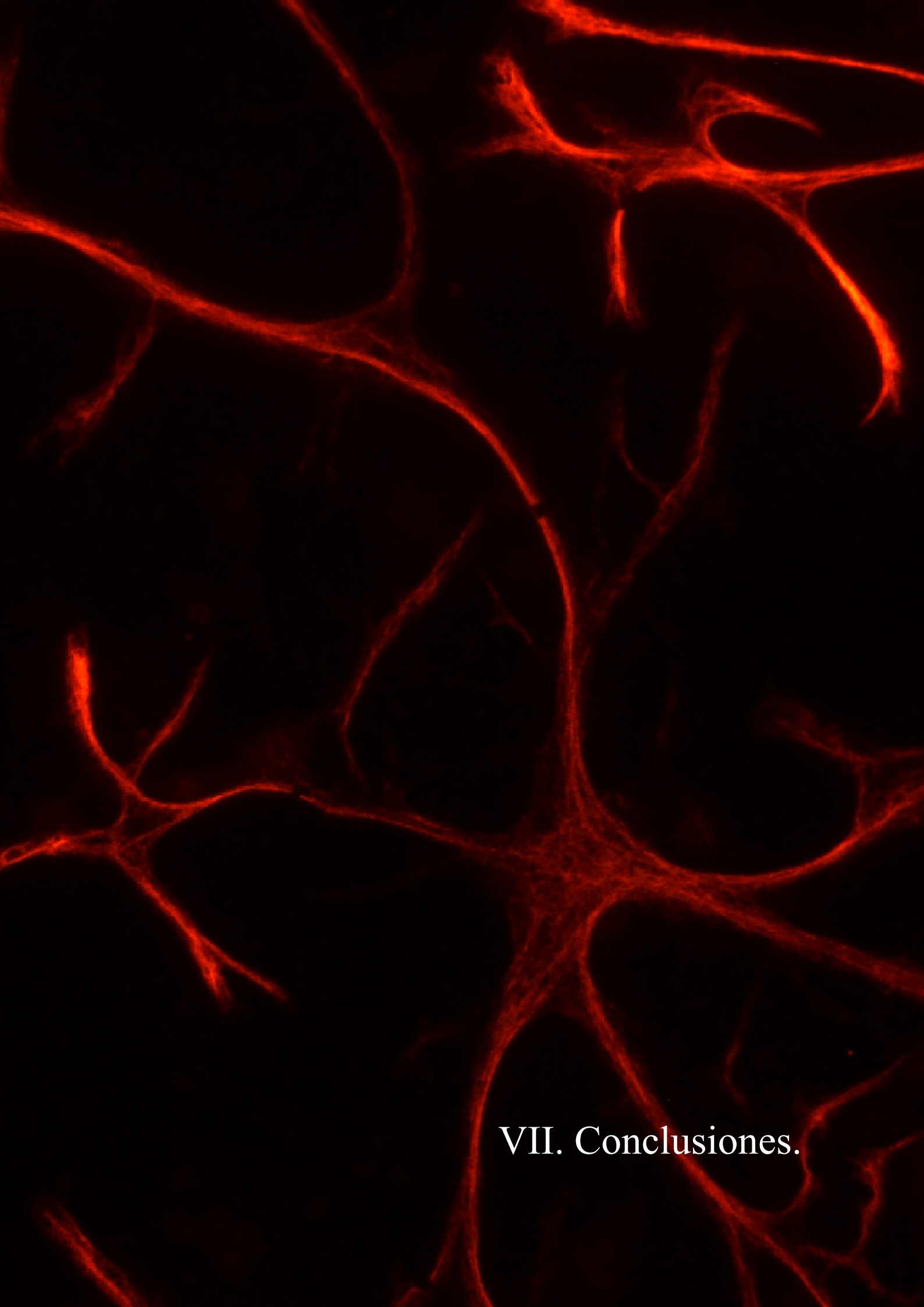
En nuestros experimentos de tratamientos combinados no hemos podido observar mejores resultados que los obtenidos con el tratamiento de cada droga individualmente. Esto puede ser debido a (como ya se ha discutido con anterioridad) que la CsA y necrostatina-1 puedan hallarse protegiendo a través de la misma vía o a la misma población. Nuestra hipótesis final, lo que creemos que puede estar pasando en nuestro modelo es que nos encontramos con dos (por lo menos dos) poblaciones neuronales que mueren de forma diferente. La primera y mayor es la que la muerte está inducida por Noxa (o Noxa y Bmf), que quizás sea activando a Bax. En este sentido, nos hubiera gustado poder realizar un cotratamiento con CsA o necrostatina-1 en combinación con un inhibidor específico de Bax.

Lamentablemente hoy en día no existe tal inhibidor. Otra opción que podríamos haber realizado, era la administración de CsA o necrostatina-1 en células transfectadas con siNoxa. Quisimos también comprobar la liberación de citocromo c en neuronas transfectadas con siNoxa para comprobar si la liberación del citocromo es inhibida en ausencia de Noxa. Lamentablemente estos experimentos no se pudieron realizar por problemas metodológicos. Cualquiera de estos experimentos nos podría haber aportado más información de las poblaciones que existen en nuestro modelo.

La neurodegeneración tras el ictus es una dolencia sin duda multifactorial y posiblemente ahí radique la extrema dificultad para hallar un tratamiento efectivo. Por ello, puede que la clave del éxito esté en realizar combinaciones de fármacos que puedan atajar todos los tipos de muerte celular descritos en isquemia cerebral (Gladstone *et al.*, 2002; Grotta, 2002; Lees *et al.*, 2006; Lo *et al.*, 2003; Shuaib *et al.*, 2007).







## VII. Conclusiones.



1. La apolipoproteína L2, aunque contiene un dominio similar al dominio BH3, no se comporta como una proteína BH3-only.
2. La muerte inducida por OGD/R no se produce a través de apoptosis.
3. Noxa juega un papel importante en la regulación de la muerte por OGD/R.
4. La CsA y la necrostatina-1 previenen parcialmente la muerte inducida por OGD/R.







## VIII. Bibliografía.



- Ahn, W. S., Bae, S. M., Lee, J. M., Namkoong, S. E., Han, S. J., Cho, Y. L., Nam, G. H., Seo, J. S., Kim, C. K., and Kim, Y. W. (2004). Searching for pathogenic gene functions to cervical cancer. *Gynecol Oncol* 93, 41-48.
- Akhtar, R. S., Ness, J. M., and Roth, K. A. (2004). Bcl-2 family regulation of neuronal development and neurodegeneration. *Biochim Biophys Acta* 1644, 189-203.
- Albers, G. W., Clark, W. M., Atkinson, R. P., Madden, K., Data, J. L., and Whitehouse, M. J. (1999). Dose escalation study of the NMDA glycine-site antagonist licostinel in acute ischemic stroke. *Stroke* 30, 508-513.
- Amaro, S., Urrea, X., Gomez-Choco, M., Obach, V., Cervera, A., Vargas, M., Torres, F., Rios, J., Planas, A. M., and Chamorro, A. (2011). Uric acid levels are relevant in patients with stroke treated with thrombolysis. *Stroke* 42, S28-32.
- Anilkumar, U., and Prehn, J. H. (2014). Anti-apoptotic BCL-2 family proteins in acute neural injury. *Front Cell Neurosci* 8, 281.
- Aouacheria, A., Brunet, F., and Gouy, M. (2005). Phylogenomics of life-or-death switches in multicellular animals: Bcl-2, BH3-Only, and BNip families of apoptotic regulators. *Mol Biol Evol* 22, 2395-2416.
- Arias, E., and Cuervo, A. M. (2010). Chaperone-mediated autophagy in protein quality control. *Curr Opin Cell Biol* 23, 184-189.
- Astrup, J., Siesjo, B. K., and Symon, L. (1981). Thresholds in cerebral ischemia - the ischemic penumbra. *Stroke* 12, 723-725.
- Back, T. (1998). Pathophysiology of the ischemic penumbra--revision of a concept. *Cell Mol Neurobiol* 18, 621-638.
- Badiola, N., Malagelada, C., Llecha, N., Hidalgo, J., Comella, J. X., Sabria, J., and Rodriguez-Alvarez, J. (2009). Activation of caspase-8 by tumour necrosis factor receptor 1 is necessary for caspase-3 activation and apoptosis in oxygen-glucose deprived cultured cortical cells. *Neurobiol Dis* 35, 438-447.
- Badiola, N., Penas, C., Minano-Molina, A., Barneda-Zahonero, B., Fado, R., Sanchez-Opazo, G., Comella, J. X., Sabria, J., Zhu, C., Blomgren, K., *et al.* (2011). Induction of ER stress in response to oxygen-glucose deprivation of cortical cultures involves the activation of the PERK and IRE-1 pathways and of caspase-12. *Cell Death Dis* 2, e149.
- Baines, C. P., Kaiser, R. A., Purcell, N. H., Blair, N. S., Osinska, H., Hambleton, M. A., Brunskill, E. W., Sayen, M. R., Gottlieb, R. A., Dorn, G. W., *et al.* (2005). Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature* 434, 658-662.
- Basáñez, G., and Hardwick, J. M. (2008). Unravelling the bcl-2 apoptosis code with a simple model system. *PLoS Biol* 6, e154.
- Berman, S. B., Chen, Y. B., Qi, B., McCaffery, J. M., Rucker, E. B., 3rd, Goebbels, S., Nave, K. A., Arnold, B. A., Jonas, E. A., Pineda, F. J., and Hardwick, J. M. (2009). Bcl-x L increases mitochondrial fission, fusion, and biomass in neurons. *J Cell Biol* 184, 707-719.
- Bernardi, P., and Petronilli, V. (1996). The permeability transition pore as a mitochondrial calcium release channel: a critical appraisal. *J Bioenerg Biomembr* 28, 131-138.
- Billen, L. P., Kokoski, C. L., Lovell, J. F., Leber, B., and Andrews, D. W. (2008). Bcl-XL inhibits membrane permeabilization by competing with Bax. *PLoS Biol* 6, e147.

- Borlongan, C. V., Yu, G., Matsukawa, N., Xu, L., Hess, D. C., Sanberg, P. R., and Wang, Y. (2005). Acute functional effects of cyclosporine-A and methylprednisolone treatment in adult rats exposed to transient ischemic stroke. *Life Sci* 76, 1503-1512.
- Brassai, A., Suvanjev, R. G., Ban, E. G., and Lakatos, M. (2014). Role of synaptic and nonsynaptic glutamate receptors in ischaemia induced neurotoxicity. *Brain Res Bull* 112C, 1-6.
- Broughton, B. R., Reutens, D. C., and Sobey, C. G. (2009). Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia. *Stroke* 40, e331-339.
- Burkard, N., Becher, J., Heindl, C., Neyses, L., Schuh, K., and Ritter, O. (2005). Targeted Proteolysis Sustains Calcineurin Activation. *Circulation* 111, 1045-1053.
- Cai, Z., Jitkaew, S., Zhao, J., Chiang, H. C., Choksi, S., Liu, J., Ward, Y., Wu, L. G., and Liu, Z. G. (2014). Plasma membrane translocation of trimerized MLKL protein is required for TNF-induced necroptosis. *Nat Cell Biol* 16, 55-65.
- Cao, G., Pei, W., Ge, H., Liang, Q., Luo, Y., Sharp, F. R., Lu, A., Ran, R., Graham, S. H., and Chen, J. (2002). In Vivo Delivery of a Bcl-xL Fusion Protein Containing the TAT Protein Transduction Domain Protects against Ischemic Brain Injury and Neuronal Apoptosis. *J Neurosci* 22, 5423-5431.
- Castillo, J., Davalos, A., Naveiro, J., and Noya, M. (1996). Neuroexcitatory amino acids and their relation to infarct size and neurological deficit in ischemic stroke. *Stroke* 27, 1060-1065.
- Castillo, J., and Leira, R. (2001). Predictors of deteriorating cerebral infarct: role of inflammatory mechanisms. Would its early treatment be useful? *Cerebrovasc Dis* 11 Suppl 1, 40-48.
- Cecconi, F. (1999). Apaf1 and the apoptotic machinery. *Cell Death Differ* 6, 1087-1098.
- Ciccone, A., and del Zoppo, G. J. (2014). Evolving role of endovascular treatment of acute ischemic stroke. *Curr Neurol Neurosci Rep* 14, 416.
- Concannon, C. G., Tuffy, L. P., Weisova, P., Bonner, H. P., Davila, D., Bonner, C., Devocelle, M. C., Strasser, A., Ward, M. W., and Prehn, J. H. (2010). AMP kinase-mediated activation of the BH3-only protein Bim couples energy depletion to stress-induced apoptosis. *J Cell Biol* 189, 83-94.
- Coultas, L., Pellegrini, M., Visvader, J. E., Lindeman, G. J., Chen, L., Adams, J. M., Huang, D. C., and Strasser, A. (2003). Bfl: a novel weakly proapoptotic member of the Bcl-2 protein family with a BH3 and a BH2 region. *Cell Death Differ* 10, 185-192.
- Chauhan, A., Sharma, U., Jagannathan, N. R., Reeta, K. H., and Gupta, Y. K. (2011). Rapamycin protects against middle cerebral artery occlusion induced focal cerebral ischemia in rats. *Behav Brain Res* 225, 603-609.
- Chautan, M., Chazal, G., Cecconi, F., Gruss, P., and Golstein, P. (1999). Interdigital cell death can occur through a necrotic and caspase-independent pathway. *Curr Biol* 9, 967-970.
- Chelluboina, B., Klopfenstein, J. D., Gujrati, M., Rao, J. S., and Veeravalli, K. K. (2014). Temporal regulation of apoptotic and anti-apoptotic molecules after middle cerebral artery occlusion followed by reperfusion. *Mol Neurobiol* 49, 50-65.
- Chen, S., Dai, Y., Harada, H., Dent, P., and Grant, S. (2007). Mcl-1 down-regulation potentiates ABT-737 lethality by cooperatively inducing Bak activation and Bax translocation. *Cancer Res* 67, 782-791.

- Chen, W., Zhou, Z., Li, L., Zhong, C. Q., Zheng, X., Wu, X., Zhang, Y., Ma, H., Huang, D., Li, W., *et al.* (2013). Diverse sequence determinants control human and mouse receptor interacting protein 3 (RIP3) and mixed lineage kinase domain-like (MLKL) interaction in necroptotic signaling. *J Biol Chem* 288, 16247-16261.
- Chen, X., Li, W., Ren, J., Huang, D., He, W. T., Song, Y., Yang, C., Li, W., Zheng, X., Chen, P., and Han, J. (2014). Translocation of mixed lineage kinase domain-like protein to plasma membrane leads to necrotic cell death. *Cell Res* 24, 105-121.
- Cho, T. H., Aguetaz, P., Campuzano, O., Charriaut-Marlangue, C., Riou, A., Berthezene, Y., Nighoghossian, N., Ovize, M., Wiart, M., and Chauveau, F. (2013). Pre- and post-treatment with cyclosporine A in a rat model of transient focal cerebral ischaemia with multimodal MRI screening. *Int J Stroke* 8, 669-674.
- Choi, D. W. (1985). Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture is calcium dependent. *Neurosci Lett* 58, 293-297.
- Choi, D. W. (1987). Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. *J Neurosci* 7, 369-379.
- Choi, D. W. (1988). Calcium-mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and role in ischemic damage. *Trends Neurosci* 11, 465-469.
- Choi, D. W. (1996). Ischemia-induced neuronal apoptosis. *Curr Opin Neurobiol* 6, 667-672.
- D'Orsi, B., Kilbride, S. M., Chen, G., Perez Alvarez, S., Bonner, H. P., Pfeiffer, S., Plesnila, N., Engel, T., Henshall, D. C., Dussmann, H., and Prehn, J. H. (2015). Bax regulates neuronal Ca<sup>2+</sup> homeostasis. *J Neurosci* 35, 1706-1722.
- Davalos, A., Alvarez-Sabin, J., Castillo, J., Diez-Tejedor, E., Ferro, J., Martinez-Vila, E., Serena, J., Segura, T., Cruz, V. T., Masjuan, J., *et al.* (2012). Citicoline in the treatment of acute ischaemic stroke: an international, randomised, multicentre, placebo-controlled study (ICTUS trial). *Lancet* 380, 349-357.
- Davis, S. M., Lees, K. R., Albers, G. W., Diener, H. C., Markabi, S., Karlsson, G., and Norris, J. (2000). Selfotel in acute ischemic stroke: possible neurotoxic effects of an NMDA antagonist. *Stroke* 31, 347-354.
- De la Torre, J. C., and Surgeon, J. W. (1976). Dexamethasone and DMSO in experimental transorbital cerebral infarction. *Stroke* 7, 577-583.
- Degenhardt, K., Mathew, R., Beaudoin, B., Bray, K., Anderson, D., Chen, G., Mukherjee, C., Shi, Y., Gelinas, C., Fan, Y., *et al.* (2006). Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer Cell* 10, 51-64.
- Degterev, A., Huang, Z., Boyce, M., Li, Y., Jagtap, P., Mizushima, N., Cuny, G. D., Mitchison, T. J., Moskowitz, M. A., and Yuan, J. (2005). Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nat Chem Biol* 1, 112-119.
- Deng, G., Su, J. H., Ivins, K. J., Van Houten, B., and Cotman, C. W. (1999). Bcl-2 facilitates recovery from DNA damage after oxidative stress. *Exp Neurol* 159, 309-318.
- Diener, H. C., AlKhedr, A., Busse, O., Hacke, W., Zingmark, P. H., Jonsson, N., and Basun, H. (2002). Treatment of acute ischaemic stroke with the low-affinity, use-dependent NMDA antagonist AR-R15896AR. A safety and tolerability study. *J Neurol* 249, 561-568.
- Diez-Tejedor, E., del Brutto, O., Alvarez Sabin, J., Munoz, M., and Abiusi, G. (2001). [Classification of the cerebrovascular diseases. Iberoamerican Cerebrovascular diseases Society]. *Rev Neurol* 33, 455-464.

- Ding, W. X., Manley, S., and Ni, H. M. (2012). The emerging role of autophagy in alcoholic liver disease. *Exp Biol Med (Maywood)* 236, 546-556.
- Dixon, S. J., Lemberg, K. M., Lamprecht, M. R., Skouta, R., Zaitsev, E. M., Gleason, C. E., Patel, D. N., Bauer, A. J., Cantley, A. M., Yang, W. S., *et al.* (2012). Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell* 149, 1060-1072.
- Droin, N. M., and Green, D. R. (2004). Role of Bcl-2 family members in immunity and disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1644, 179.
- Duchateau, P. N., Pullinger, C. R., Cho, M. H., Eng, C., and Kane, J. P. (2001). Apolipoprotein L gene family: tissue-specific expression, splicing, promoter regions; discovery of a new gene. *J Lipid Res* 42, 620-630.
- Dyker, A. G., Edwards, K. R., Fayad, P. B., Hormes, J. T., and Lees, K. R. (1999). Safety and tolerability study of aptiganel hydrochloride in patients with an acute ischemic stroke. *Stroke* 30, 2038-2042.
- El Kossi, M. M., and Zakhary, M. M. (2000). Oxidative stress in the context of acute cerebrovascular stroke. *Stroke* 31, 1889-1892.
- Fan, Y. Y., Shen, Z., He, P., Jiang, L., Hou, W. W., Shen, Y., Zhang, X. N., Hu, W. W., and Chen, Z. (2014). A novel neuroprotective strategy for ischemic stroke: transient mild acidosis treatment by CO<sub>2</sub> inhalation at reperfusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 34, 275-283.
- Felderhoff-Mueser, U., Taylor, D. L., Greenwood, K., Kozma, M., Stibenz, D., Joashi, U. C., Edwards, A. D., and Mehmet, H. (2000). Fas/CD95/APO-1 can function as a death receptor for neuronal cells in vitro and in vivo and is upregulated following cerebral hypoxic-ischemic injury to the developing rat brain. *Brain Pathol* 10, 17-29.
- Fink, K., Zhu, J., Namura, S., Shimizu-Sasamata, M., Endres, M., Ma, J., Dalkara, T., Yuan, J., and Moskowitz, M. A. (1998). Prolonged therapeutic window for ischemic brain damage caused by delayed caspase activation. *J Cereb Blood Flow Metab* 18, 1071-1076.
- Fletcher, L., Evans, T. M., Watts, L. T., Jimenez, D. F., and Digicaylioglu, M. (2013). Rapamycin treatment improves neuron viability in an in vitro model of stroke. *PLoS One* 8, e68281.
- Ford, G., Xu, Z., Gates, A., Jiang, J., and Ford, B. D. (2006). Expression Analysis Systematic Explorer (EASE) analysis reveals differential gene expression in permanent and transient focal stroke rat models. *Brain Res* 1071, 226-236.
- Frenzel, A., Grespi, F., Chmielewski, W., and Villunger, A. (2009). Bcl2 family proteins in carcinogenesis and the treatment of cancer. *Apoptosis* 14, 584-596.
- Fykse, E. M., and Fonnum, F. (1996). Amino acid neurotransmission: dynamics of vesicular uptake. *Neurochem Res* 21, 1053-1060.
- Galea, E., Feinstein, D. L., and Reis, D. J. (1992). Induction of calcium-independent nitric oxide synthase activity in primary rat glial cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 10945-10949.
- Galluzzi, L., Vitale, I., Abrams, J. M., Alnemri, E. S., Bachrecke, E. H., Blagosklonny, M. V., Dawson, T. M., Dawson, V. L., El-Deiry, W. S., Fulda, S., *et al.* (2009). Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ* 19, 107-120.
- Gelinas, C., and White, E. (2005). BH3-only proteins in control: specificity regulates MCL-1 and BAK-mediated apoptosis. *Genes Dev* 19, 1263-1268.

- Giam, M., Okamoto, T., Minter, J. D., Strasser, A., and Bouillet, P. (2012). Bcl-2 family member Bcl-G is not a proapoptotic protein. *Cell Death Dis* 3, e404.
- Gill, R., Soriano, M., Blomgren, K., Hagberg, H., Wybrecht, R., Miss, M. T., Hoefer, S., Adam, G., Niederhauser, O., Kemp, J. A., and Loetscher, H. (2002). Role of caspase-3 activation in cerebral ischemia-induced neurodegeneration in adult and neonatal brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 22, 420-430.
- Gladstone, D. J., Black, S. E., and Hakim, A. M. (2002). Toward wisdom from failure: lessons from neuroprotective stroke trials and new therapeutic directions. *Stroke* 33, 2123-2136.
- Grotta, J. (2002). Neuroprotection is unlikely to be effective in humans using current trial designs. *Stroke* 33, 306-307.
- Gu, Z., Sun, Y., Liu, K., Wang, F., Zhang, T., Li, Q., Shen, L., Zhou, L., Dong, L., Shi, N., *et al.* (2013). The role of autophagic and lysosomal pathways in ischemic brain injury. *Neural Regen Res* 8, 2117-2125.
- Hakem, R., Hakem, A., Duncan, G. S., Henderson, J. T., Woo, M., Soengas, M. S., Elia, A., de la Pompa, J. L., Kagi, D., Khoo, W., *et al.* (1998). Differential requirement for caspase 9 in apoptotic pathways in vivo. *Cell* 94, 339-352.
- Halestrap, A. P. (2014). The C Ring of the F1Fo ATP Synthase Forms the Mitochondrial Permeability Transition Pore: A Critical Appraisal. *Front Oncol* 4, 234.
- Halestrap, A. P., and Richardson, A. P. (2015). The mitochondrial permeability transition: A current perspective on its identity and role in ischaemia/reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol* 78C, 129-141.
- Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.
- Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674.
- Hardingham, G. E., Fukunaga, Y., and Bading, H. (2002). Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. *Nat Neurosci* 5, 405-414.
- Hayashi, J., Stoyanova, R., and Seeger, C. (2005). The transcriptome of HCV replicon expressing cell lines in the presence of alpha interferon. *Virology* 335, 264-275.
- He, S., Wang, L., Miao, L., Wang, T., Du, F., Zhao, L., and Wang, X. (2009). Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necrotic response to TNF-alpha. *Cell* 137, 1100-1111.
- Hetz, C., and Glimcher, L. (2008). The daily job of night killers: alternative roles of the BCL-2 family in organelle physiology. *Trends in Cell Biology* 18, 38.
- Horrevoets, A. J., Fontijn, R. D., van Zonneveld, A. J., de Vries, C. J., ten Cate, J. W., and Pannekoek, H. (1999). Vascular endothelial genes that are responsive to tumor necrosis factor-alpha in vitro are expressed in atherosclerotic lesions, including inhibitor of apoptosis protein-1, stannin, and two novel genes. *Blood* 93, 3418-3431.
- Hsu, H., Xiong, J., and Goeddel, D. V. (1995). The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell* 81, 495-504.



- Huang, Z., Huang, P. L., Panahian, N., Dalkara, T., Fishman, M. C., and Moskowitz, M. A. (1994). Effects of cerebral ischemia in mice deficient in neuronal nitric oxide synthase. *Science* 265, 1883-1885.
- Ikonomidou, C., and Turski, L. (2002). Why did NMDA receptor antagonists fail clinical trials for stroke and traumatic brain injury? *Lancet Neurol* 1, 383-386.
- Ingrassia, R., Lanzillotta, A., Sarnico, I., Benarese, M., Blasi, F., Borgese, L., Bilo, F., Depero, L., Chiarugi, A., Spano, P. F., and Pizzi, M. (2012). 1B/(-)IRE DMT1 expression during brain ischemia contributes to cell death mediated by NF-kappaB/RelA acetylation at Lys310. *PLoS One* 7, e38019.
- Jin, Y.-J. (2003). Effect of a novel free radical scavenger, edaravone (MCI-186), on acute brain infarction. Randomized, placebo-controlled, double-blind study at multicenters. *Cerebrovasc Dis* 15, 222-229.
- Kaczmarek, K., Studencka, M., Meinhardt, A., Wiczerzak, K., Thoms, S., Engel, W., and Grzmil, P. (2011). Overexpression of peroxisomal testis-specific 1 protein induces germ cell apoptosis and leads to infertility in male mice. *Mol Biol Cell* 22, 1766-1779.
- Kaste, M., Murayama, S., Ford, G. A., Dippel, D. W., Walters, M. R., and Tatlisumak, T. (2013). Safety, tolerability and pharmacokinetics of MCI-186 in patients with acute ischemic stroke: new formulation and dosing regimen. *Cerebrovasc Dis* 36, 196-204.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., and Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26, 239-257.
- Khaspekov, L., Friberg, H., Halestrap, A., Viktorov, I., and Wieloch, T. (1999). Cyclosporin A and its nonimmunosuppressive analogue N-Me-Val-4-cyclosporin A mitigate glucose/oxygen deprivation-induced damage to rat cultured hippocampal neurons. *Eur J Neurosci* 11, 3194-3198.
- Kogel, D., Svensson, B., Copanaki, E., Anguissola, S., Bonner, C., Thurow, N., Gudorf, D., Hetschko, H., Muller, T., Peters, M., et al. (2006). Induction of transcription factor CEBP homology protein mediates hypoglycaemia-induced necrotic cell death in human neuroblastoma cells. *J Neurochem* 99, 952-964.
- Konig, H. G., Rehm, M., Gudorf, D., Krajewski, S., Gross, A., Ward, M. W., and Prehn, J. H. (2007). Full length Bid is sufficient to induce apoptosis of cultured rat hippocampal neurons. *BMC Cell Biol* 8, 7.
- Korsmeyer, S. J., Wei, M. C., Saito, M., Weiler, S., Oh, K. J., and Schlesinger, P. H. (2000). Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. *Cell Death Differ* 7, 1166-1173.
- Krajewski, S., Mai, J. K., Krajewska, M., Sikorska, M., Mossakowski, M. J., and Reed, J. C. (1995). Upregulation of bax protein levels in neurons following cerebral ischemia. *J Neurosci* 15, 6364-6376.
- Krupinski, J., Vodovotz, Y., Li, C., Slowik, A., Beevers, D., Flanders, K. C., Lip, G., Kumar, P., and Szczudlik, A. (1998). Inducible nitric oxide production and expression of transforming growth factor-beta1 in serum and CSF after cerebral ischaemic stroke in man. *Nitric Oxide* 2, 442-453.
- Kuma, A., Hatano, M., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakaya, H., Yoshimori, T., Ohsumi, Y., Tokuhisa, T., and Mizushima, N. (2004). The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature* 432, 1032-1036.

- Kuroda, S., and Siesjö, B. K. (1996). Postischemic administration of FK506 reduces infarct volume following transient focal brain ischemia. *Neuroscience Research Communications* 19, 83-90.
- Kurz, T., Gustafsson, B., and Brunk, U. T. (2006). Intralysosomal iron chelation protects against oxidative stress-induced cellular damage. *Febs J* 273, 3106-3117.
- Lanave, C., Santamaria, M., and Saccone, C. (2004). Comparative genomics: the evolutionary history of the Bcl-2 family. *Gene* 333, 71.
- Lee, S. H., Choi, J., Kim, H., Lee, D. H., Roh, G. S., Kim, H. J., Kang, S. S., Choi, W. S., and Cho, G. J. FK506 reduces calpain-regulated calcineurin activity in both the cytoplasm and the nucleus. *Anat Cell Biol* 47, 91-100.
- Lees, K. R., Zivin, J. A., Ashwood, T., Davalos, A., Davis, S. M., Diener, H. C., Grotta, J., Lyden, P., Shuaib, A., Hardemark, H. G., and Wasiewski, W. W. (2006). NXY-059 for acute ischemic stroke. *N Engl J Med* 354, 588-600.
- Lemasters, J. J. (1999). The mitochondrial permeability transition and the calcium, oxygen and pH paradoxes: one paradox after another. *Cardiovasc Res* 44, 470-473.
- Li, H., Chen, Y., Jones, A. F., Sanger, R. H., Collis, L. P., Flannery, R., McNay, E. C., Yu, T., Schwarzenbacher, R., Bossy, B., *et al.* (2008a). Bcl-xL induces Drp1-dependent synapse formation in cultured hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 2169-2174.
- Li, J., McQuade, T., Siemer, A. B., Napetschnig, J., Moriwaki, K., Hsiao, Y. S., Damko, E., Moquin, D., Walz, T., McDermott, A., *et al.* (2012). The RIP1/RIP3 necrosome forms a functional amyloid signaling complex required for programmed necrosis. *Cell* 150, 339-350.
- Li, Y., Yang, X., Ma, C., Qiao, J., and Zhang, C. (2008b). Necroptosis contributes to the NMDA-induced excitotoxicity in rat's cultured cortical neurons. *Neurosci Lett* 447, 120-123.
- Liao, W., Goh, F. Y., Betts, R. J., Kemeny, D. M., Tam, J., Bay, B. H., and Wong, W. S. (2011). A novel anti-apoptotic role for apolipoprotein L2 in IFN-gamma-induced cytotoxicity in human bronchial epithelial cells. *J Cell Physiol* 226, 397-406.
- Lim, S. Y., Davidson, S. M., Mocanu, M. M., Yellon, D. M., and Smith, C. C. (2007). The cardioprotective effect of necrostatin requires the cyclophilin-D component of the mitochondrial permeability transition pore. *Cardiovasc Drugs Ther* 21, 467-469.
- Lin, J., Li, H., Yang, M., Ren, J., Huang, Z., Han, F., Huang, J., Ma, J., Zhang, D., Zhang, Z., *et al.* (2013). A role of RIP3-mediated macrophage necrosis in atherosclerosis development. *Cell Rep* 3, 200-210.
- Linkermann, A., Brasen, J. H., Himmerkus, N., Liu, S., Huber, T. B., Kunzendorf, U., and Krautwald, S. (2012). Rip1 (receptor-interacting protein kinase 1) mediates necroptosis and contributes to renal ischemia/reperfusion injury. *Kidney Int* 81, 751-761.
- Linkermann, A., and Green, D. R. (2014). Necroptosis. *N Engl J Med* 370, 455-465.
- Linkermann, A., Skouta, R., Himmerkus, N., Mulay, S. R., Dewitz, C., De Zen, F., Prokai, A., Zuchtriegel, G., Krombach, F., Welz, P. S., *et al.* (2014). Synchronized renal tubular cell death involves ferroptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 16836-16841.
- Lipton, P. (1999). Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev* 79, 1431-1568.

- Little, J. R., Spetzler, R. F., Roski, R. A., Selman, W. R., Zabramski, J., and Lesser, R. P. (1983). Ineffectiveness of DMSO in treating experimental brain ischemia. *Ann N Y Acad Sci* 411, 269-277.
- Liu, Y., Wong, T. P., Aarts, M., Rooyakkers, A., Liu, L., Lai, T. W., Wu, D. C., Lu, J., Tymianski, M., Craig, A. M., and Wang, Y. T. (2007). NMDA receptor subunits have differential roles in mediating excitotoxic neuronal death both in vitro and in vivo. *J Neurosci* 27, 2846-2857.
- Liu, Z., Lu, H., Jiang, Z., Pastuszyn, A., and Hu, C.-a. A. (2005). Apolipoprotein L6, a Novel Proapoptotic Bcl-2 Homology 3-Only Protein, Induces Mitochondria-Mediated Apoptosis in Cancer Cells. *Mol Cancer Res* 3, 21-31.
- Lo, E. H., Dalkara, T., and Moskowitz, M. A. (2003). Mechanisms, challenges and opportunities in stroke. *Nat Rev Neurosci* 4, 399-415.
- Logue, S. E., and Martin, S. J. (2008). Caspase activation cascades in apoptosis. *Biochem Soc Trans* 36, 1-9.
- Lomonosova, E., and Chinnadurai, G. (2008). BH3-only proteins in apoptosis and beyond: an overview. *Oncogene* 27, S2.
- Lowman, X. H., McDonnell, M. A., Kosloske, A., Odumade, O. A., Jenness, C., Karim, C. B., Jemmerson, R., and Kelekar, A. (2010). The proapoptotic function of Noxa in human leukemia cells is regulated by the kinase Cdk5 and by glucose. *Mol Cell* 40, 823-833.
- Malagelada, C., Xifro, X., Minano, A., Sabria, J., and Rodriguez-Alvarez, J. (2005). Contribution of caspase-mediated apoptosis to the cell death caused by oxygen-glucose deprivation in cortical cell cultures. *Neurobiol Dis* 20, 27-37.
- Malinski, T., Bailey, F., Zhang, Z. G., and Chopp, M. (1993). Nitric oxide measured by a porphyrinic microsensor in rat brain after transient middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 13, 355-358.
- Martin-Villalba, A., Herr, I., Jeremias, I., Hahne, M., Brandt, R., Vogel, J., Schenkel, J., Herdegen, T., and Debatin, K. M. (1999). CD95 ligand (Fas-L/APO-1L) and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand mediate ischemia-induced apoptosis in neurons. *J Neurosci* 19, 3809-3817.
- Martinou, J. C., Dubois-Dauphin, M., Staple, J. K., Rodriguez, I., Frankowski, H., Missotten, M., Albertini, P., Talabot, D., Catsicas, S., Pietra, C., and et al. (1994). Overexpression of BCL-2 in transgenic mice protects neurons from naturally occurring cell death and experimental ischemia. *Neuron* 13, 1017-1030.
- Marzella, L., Ahlberg, J., and Glaumann, H. (1981). Autophagy, heterophagy, microautophagy and crinophagy as the means for intracellular degradation. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 36, 219-234.
- Mizushima, N., Yamamoto, A., Matsui, M., Yoshimori, T., and Ohsumi, Y. (2004). In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Mol Biol Cell* 15, 1101-1111.
- Mizushima, N., Yoshimori, T., and Levine, B. (2010). Methods in mammalian autophagy research. *Cell* 140, 313-326.
- Monajemi, H., Fontijn, R. D., Pannekoek, H., and Horrevoets, A. J. (2002). The apolipoprotein L gene cluster has emerged recently in evolution and is expressed in human vascular tissue. *Genomics* 79, 539-546.

- Moro, M. A., Almeida, A., Bolanos, J. P., and Lizasoain, I. (2005). Mitochondrial respiratory chain and free radical generation in stroke. *Free Radic Biol Med* 39, 1291-1304.
- Moruno-Manchon, J. F., Perez-Jimenez, E., and Knecht, E. (2013). Glucose induces autophagy under starvation conditions by a p38 MAPK-dependent pathway. *Biochem J* 449, 497-506.
- Motoyama, N., Wang, F., Roth, K. A., Sawa, H., Nakayama, K., Nakayama, K., Negishi, I., Senju, S., Zhang, Q., Fujii, S., and et al. (1995). Massive cell death of immature hematopoietic cells and neurons in Bcl-x-deficient mice. *Science* 267, 1506-1510.
- Munoz-Pinedo, C. (2012). Signaling pathways that regulate life and cell death: evolution of apoptosis in the context of self-defense. *Adv Exp Med Biol* 738, 124-143.
- Nakagawa, T., Shimizu, S., Watanabe, T., Yamaguchi, O., Otsu, K., Yamagata, H., Inohara, H., Kubo, T., and Tsujimoto, Y. (2005). Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature* 434, 652-658.
- Oberst, A., Dillon, C. P., Weinlich, R., McCormick, L. L., Fitzgerald, P., Pop, C., Hakem, R., Salvesen, G. S., and Green, D. R. (2011). Catalytic activity of the caspase-8-FLIP(L) complex inhibits RIPK3-dependent necrosis. *Nature* 471, 363-367.
- Oerlemans, M. I., Liu, J., Arslan, F., den Ouden, K., van Middelaar, B. J., Doevendans, P. A., and Sluijter, J. P. (2012). Inhibition of RIP1-dependent necrosis prevents adverse cardiac remodeling after myocardial ischemia-reperfusion in vivo. *Basic Res Cardiol* 107, 270.
- Olney, J. W., Sharpe, L. G., and Feigin, R. D. (1972). Glutamate-induced brain damage in infant primates. *J Neuropathol Exp Neurol* 31, 464-488.
- Page, N. M., Butlin, D. J., Lomthaisong, K., and Lowry, P. J. (2001). The human apolipoprotein L gene cluster: identification, classification, and sites of distribution. *Genomics* 74, 71-78.
- Park, H. H. (2012). Structural features of caspase-activating complexes. *Int J Mol Sci* 13, 4807-4818.
- Perciavalle, R. M., Stewart, D. P., Koss, B., Lynch, J., Milasta, S., Bathina, M., Temirov, J., Cleland, M. M., Pelletier, S., Schuetz, J. D., et al. (2012). Anti-apoptotic MCL-1 localizes to the mitochondrial matrix and couples mitochondrial fusion to respiration. *Nat Cell Biol* 14, 575-583.
- Perez-Morga, D., Vanhollebeke, B., Paturiaux-Hanocq, F., Nolan, D. P., Lins, L., Homble, F., Vanhamme, L., Tebabi, P., Pays, A., Poelvoorde, P., et al. (2005). Apolipoprotein L-I Promotes Trypanosome Lysis by Forming Pores in Lysosomal Membranes. *Science* 309, 469-472.
- Pfeiffer, S., Anilkumar, U., Chen, G., Ramirez-Peinado, S., Galindo-Moreno, J., Munoz-Pinedo, C., and Prehn, J. H. (2014). Analysis of BH3-only proteins upregulated in response to oxygen/glucose deprivation in cortical neurons identifies Bmf but not Noxa as potential mediator of neuronal injury. *Cell Death Dis* 5, e1456.
- Piot, C., Croisille, P., Staat, P., Thibault, H., Rioufol, G., Mewton, N., Elbelghiti, R., Cung, T. T., Bonnefoy, E., Angoulvant, D., et al. (2008). Effect of cyclosporine on reperfusion injury in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 359, 473-481.
- Plesnila, N., Zinkel, S., Amin-Hanjani, S., Qiu, J., Korsmeyer, S. J., and Moskowitz, M. A. (2002). Function of BID -- a molecule of the bcl-2 family -- in ischemic cell death in the brain. *Eur Surg Res* 34, 37-41.
- Rami, A., and Kogel, D. (2008). Apoptosis meets autophagy-like cell death in the ischemic penumbra: Two sides of the same coin? *Autophagy* 4, 422-426.

- Ramirez-Peinado, S., Alcazar-Limones, F., Lagares-Tena, L., El Mjiyad, N., Caro-Maldonado, A., Tirado, O. M., and Munoz-Pinedo, C. (2011). 2-deoxyglucose induces Noxa-dependent apoptosis in alveolar rhabdomyosarcoma. *Cancer Res* 71, 6796-6806.
- Ramirez-Peinado, S., Leon-Annicchiarico, C. L., Galindo-Moreno, J., Iurlaro, R., Caro-Maldonado, A., Prehn, J. H., Ryan, K. M., and Munoz-Pinedo, C. (2013). Glucose-starved cells do not engage in prosurvival autophagy. *J Biol Chem* 288, 30387-30398.
- Reoyo Rodríguez, J. (2012). Regulación de la proteína Kidins220/ARMS en la excitotoxicidad e isquemia cerebral: implicaciones en supervivencia neuronal. Tesis Doctoral.
- Rinkenberger, J. L., Horning, S., Klocke, B., Roth, K., and Korsmeyer, S. J. (2000). Mcl-1 deficiency results in peri-implantation embryonic lethality. *Genes Dev* 14, 23-27.
- Roca, F. J., and Ramakrishnan, L. (2013). TNF dually mediates resistance and susceptibility to mycobacteria via mitochondrial reactive oxygen species. *Cell* 153, 521-534.
- Rosso, C., Corvol, J. C., Pires, C., Crozier, S., Attal, Y., Jacqueminet, S., Deltour, S., Multlu, G., Leger, A., Meresse, I., *et al.* Intensive versus subcutaneous insulin in patients with hyperacute stroke: results from the randomized INSULINFARCT trial. *Stroke* 43, 2343-2349.
- Rothwell, N. J., and Relton, J. K. (1993). Involvement of cytokines in acute neurodegeneration in the CNS. *Neurosci Biobehav Rev* 17, 217-227.
- Rudner, J., Jendrossek, V., and Belka, C. (2002). New insights in the role of Bcl-2 Bcl-2 and the endoplasmic reticulum. *Apoptosis* 7, 441-447.
- Rytter, A., Cronberg, T., Asztely, F., Nemali, S., and Wieloch, T. (2003). Mouse hippocampal organotypic tissue cultures exposed to in vitro "ischemia" show selective and delayed CA1 damage that is aggravated by glucose. *J Cereb Blood Flow Metab* 23, 23-33.
- Sacco, R. L., DeRosa, J. T., Haley, E. C., Jr., Levin, B., Ordronneau, P., Phillips, S. J., Rundek, T., Snipes, R. G., and Thompson, J. L. (2001). Glycine antagonist in neuroprotection for patients with acute stroke: GAIN Americas: a randomized controlled trial. *Jama* 285, 1719-1728.
- Sana, T. R., Janatpour, M. J., Sathe, M., McEvoy, L. M., and McClanahan, T. K. (2005). Microarray analysis of primary endothelial cells challenged with different inflammatory and immune cytokines. *Cytokine* 29, 256-269.
- Saver, J. L. (2008). Citicoline: update on a promising and widely available agent for neuroprotection and neurorepair. *Rev Neurol Dis* 5, 167-177.
- Savill, J., and Fadok, V. (2000). Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* 407, 784-788.
- Shalini, S., Dorstyn, L., Dawar, S., and Kumar, S. (2014). Old, new and emerging functions of caspases. *Cell Death Differ*.
- Shamas-Din, A., Brahmabhatt, H., Leber, B., and Andrews, D. W. (2011). BH3-only proteins: Orchestrators of apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1813, 508-520.
- Sharkey, J., and Butcher, S. P. (1994). Immunophilins mediate the neuroprotective effects of FK506 in focal cerebral ischaemia. *Nature* 371, 336-339.
- Sheldon, A. L., and Robinson, M. B. (2007). The role of glutamate transporters in neurodegenerative diseases and potential opportunities for intervention. *Neurochem Int* 51, 333-355.

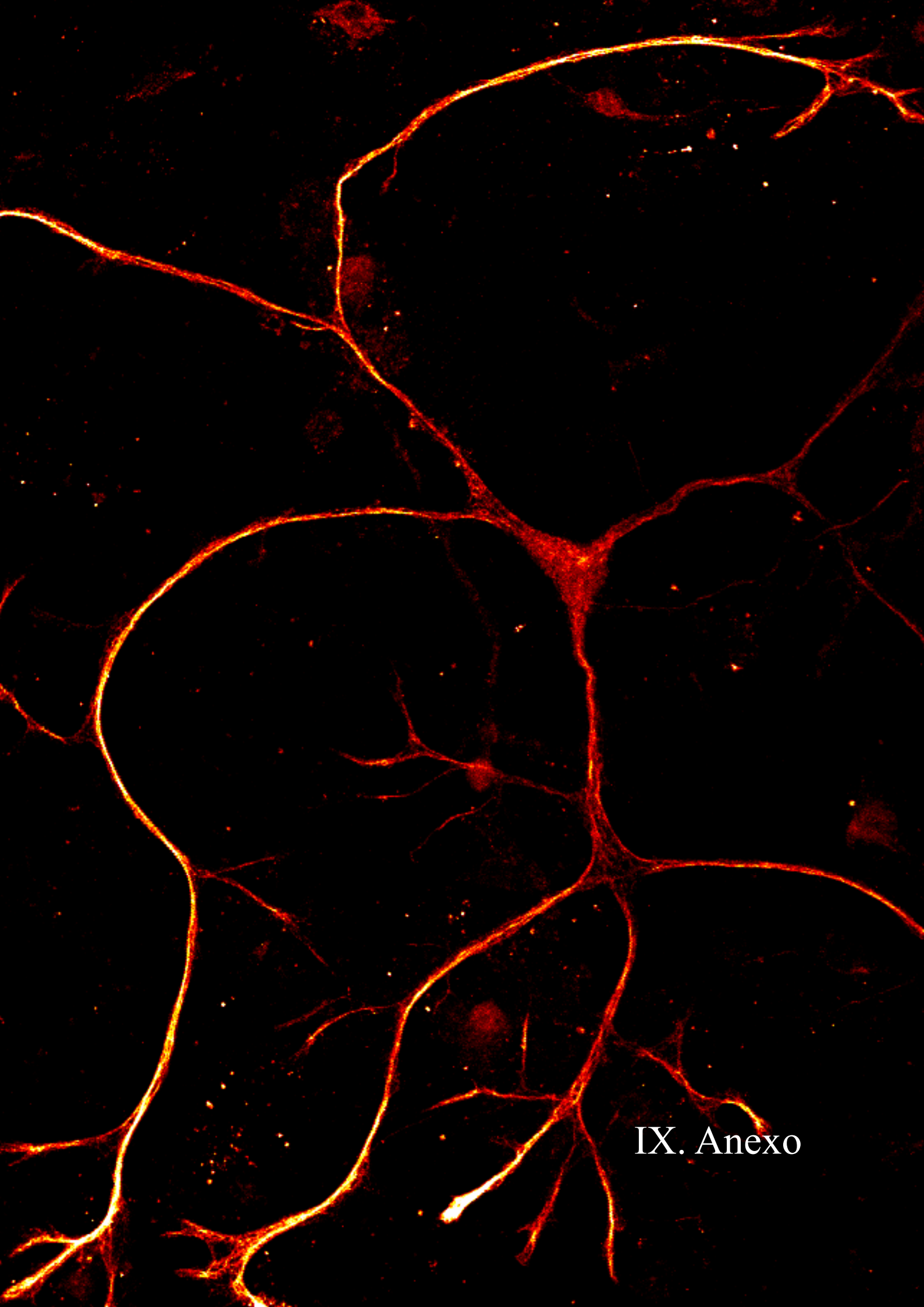
- Shimizu, S., Kanaseki, T., Mizushima, N., Mizuta, T., Arakawa-Kobayashi, S., Thompson, C. B., and Tsujimoto, Y. (2004). Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nat Cell Biol* 6, 1221-1228.
- Shinohara, Y., Saito, I., Kobayashi, S., and Uchiyama, S. (2009). Edaravone (radical scavenger) versus sodium ozagrel (antiplatelet agent) in acute noncardioembolic ischemic stroke (EDO trial). *Cerebrovasc Dis* 27, 485-492.
- Shuaib, A., Lees, K. R., Lyden, P., Grotta, J., Davalos, A., Davis, S. M., Diener, H. C., Ashwood, T., Wasiewski, W. W., and Emeribe, U. (2007). NXY-059 for the treatment of acute ischemic stroke. *N Engl J Med* 357, 562-571.
- Singh, R., and Cuervo, A. M. (2011). Autophagy in the cellular energetic balance. *Cell Metab* 13, 495-504.
- Sinha, S., and Levine, B. (2008). The autophagy effector Beclin 1: a novel BH3-only protein. *Oncogene* 27 Suppl 1, S137-148.
- Siren, A. L., Fratelli, M., Brines, M., Goemans, C., Casagrande, S., Lewczuk, P., Keenan, S., Gleiter, C., Pasquali, C., Capobianco, A., *et al.* (2001). Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 4044-4049.
- Steckley, D., Karajgikar, M., Dale, L. B., Fuerth, B., Swan, P., Drummond-Main, C., Poulter, M. O., Ferguson, S. S., Strasser, A., and Cregan, S. P. (2007). Puma is a dominant regulator of oxidative stress induced Bax activation and neuronal apoptosis. *J Neurosci* 27, 12989-12999.
- Stephenson, F. A. (2006). Structure and trafficking of NMDA and GABAA receptors. *Biochem Soc Trans* 34, 877-881.
- Stojdl, D. F., Lichty, B. D., tenOever, B. R., Paterson, J. M., Power, A. T., Knowles, S., Marius, R., Reynard, J., Poliquin, L., Atkins, H., *et al.* (2003). VSV strains with defects in their ability to shutdown innate immunity are potent systemic anti-cancer agents. *Cancer Cell* 4, 263-275.
- Strasser, A. (2005). The role of BH3-only proteins in the immune system. *Nat Rev Immunol* 5, 189-200.
- Sun, J., Luan, Q., Dong, H., Song, W., Xie, K., Hou, L., and Xiong, L. (2012). Inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening contributes to the neuroprotective effects of ischemic postconditioning in rats. *Brain Res* 1436, 101-110.
- Suzuki, T., and Inoki, K. (2011). Spatial regulation of the mTORC1 system in amino acids sensing pathway. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 43, 671-679.
- Tischner, D., and Villunger, A. (2012). Bcl-G acquitted of murder! *Cell Death Dis* 3, e405.
- Vanden Berghe, T., Linkermann, A., Jouan-Lanhuet, S., Walczak, H., and Vandenabeele, P. (2014). Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15, 135-147.
- Vanhamme, L., Paturiaux-Hanocq, F., Poelvoorde, P., Nolan, D. P., Lins, L., Van Den Abbeele, J., Pays, A., Tebabi, P., Van Xong, H., Jacquet, A., *et al.* (2003). Apolipoprotein L-I is the trypanosome lytic factor of human serum. *Nature* 422, 83-87.
- Vanhollebeke, B., and Pays, E. (2006). The function of apolipoproteins L. *Cell Mol Life Sci* 63, 1937-1944.

- Vascotto, C., Cesaratto, L., D'Ambrosio, C., Scaloni, A., Avellini, C., Paron, I., Baccarani, U., Adani, G. L., Tiribelli, C., Quadrifoglio, F., and Tell, G. (2006). Proteomic analysis of liver tissues subjected to early ischemia/reperfusion injury during human orthotopic liver transplantation. *Proteomics* 6, 3455-3465.
- Vaseva, A. V., Marchenko, N. D., Ji, K., Tsirka, S. E., Holzmann, S., and Moll, U. M. (2012). p53 opens the mitochondrial permeability transition pore to trigger necrosis. *Cell* 149, 1536-1548.
- Velier, J. J., Ellison, J. A., Kikly, K. K., Spera, P. A., Barone, F. C., and Feuerstein, G. Z. (1999). Caspase-8 and caspase-3 are expressed by different populations of cortical neurons undergoing delayed cell death after focal stroke in the rat. *J Neurosci* 19, 5932-5941.
- Vercammen, D., Beyaert, R., Denecker, G., Goossens, V., Van Loo, G., Declercq, W., Grooten, J., Fiers, W., and Vandenabeele, P. (1998). Inhibition of caspases increases the sensitivity of L929 cells to necrosis mediated by tumor necrosis factor. *J Exp Med* 187, 1477-1485.
- Wan, G., Zhaorigetu, S., Liu, Z., Kaini, R., Jiang, Z., and Hu, C. A. (2008). Apolipoprotein L1, a novel Bcl-2 homology domain 3-only lipid-binding protein, induces autophagic cell death. *J Biol Chem* 283, 21540-21549.
- Warach, S., Pettigrew, L. C., Dashe, J. F., Pullicino, P., Lefkowitz, D. M., Sabounjian, L., Harnett, K., Schwiderski, U., and Gammans, R. (2000). Effect of citicoline on ischemic lesions as measured by diffusion-weighted magnetic resonance imaging. *Citicoline 010 Investigators. Ann Neurol* 48, 713-722.
- Wensveen, F. M., Alves, N. L., Derks, I. A., Reedquist, K. A., and Eldering, E. (2011). Apoptosis induced by overall metabolic stress converges on the Bcl-2 family proteins Noxa and Mcl-1. *Apoptosis* 16, 708-721.
- Willis, S. N., Chen, L., Dewson, G., Wei, A., Naik, E., Fletcher, J. I., Adams, J. M., and Huang, D. C. (2005). Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins. *Genes Dev* 19, 1294-1305.
- Wong, L. F., Ralph, G. S., Walmsley, L. E., Bienemann, A. S., Parham, S., Kingsman, S. M., Uney, J. B., and Mazarakis, N. D. (2005). Lentiviral-mediated delivery of Bcl-2 or GDNF protects against excitotoxicity in the rat hippocampus. *Mol Ther* 11, 89-95.
- Wu, X., Wang, H., Bai, L., Yu, Y., Sun, Z., Yan, Y., and Zhou, J. (2013). Mitochondrial proteomic analysis of human host cells infected with H3N2 swine influenza virus. *J Proteomics* 91, 136-150.
- Xi, H., Barredo, J. C., Merchan, J. R., and Lampidis, T. J. (2013). Endoplasmic reticulum stress induced by 2-deoxyglucose but not glucose starvation activates AMPK through CaMKKbeta leading to autophagy. *Biochem Pharmacol* 85, 1463-1477.
- Xu, X., Chua, K. W., Chua, C. C., Liu, C. F., Hamdy, R. C., and Chua, B. H. (2010). Synergistic protective effects of humanin and necrostatin-1 on hypoxia and ischemia/reperfusion injury. *Brain Res* 1355, 189-194.
- Yagoda, N., von Rechenberg, M., Zaganjor, E., Bauer, A. J., Yang, W. S., Fridman, D. J., Wolpaw, A. J., Smukste, I., Peltier, J. M., Boniface, J. J., *et al.* (2007). RAS-RAF-MEK-dependent oxidative cell death involving voltage-dependent anion channels. *Nature* 447, 864-868.
- Yang, Q. Z., Lei, C., Lu, Z. H., Wang, B. R., and Xiong, L. Z. (2008). [Neuroprotective effects of combined application of JAK-STAT signal pathway inhibitor and free radical scavenger on

- focal cerebral ischemia/reperfusion injury in rats]. *Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue* 20, 641-644.
- Youle, R. J., and Strasser, A. (2008). The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 47-59.
- Yu, Z., Liu, N., Li, Y., Xu, J., and Wang, X. (2013). Neuroglobin overexpression inhibits oxygen-glucose deprivation-induced mitochondrial permeability transition pore opening in primary cultured mouse cortical neurons. *Neurobiol Dis* 56, 95-103.
- Yuen, C. M., Sun, C. K., Lin, Y. C., Chang, L. T., Kao, Y. H., Yen, C. H., Chen, Y. L., Tsai, T. H., Chua, S., Shao, P. L., *et al.* (2011). Combination of cyclosporine and erythropoietin improves brain infarct size and neurological function in rats after ischemic stroke. *J Transl Med* 9, 141.
- Zamzami, N., and Kroemer, G. (2001). The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 67-71.
- Zhang, J., Dawson, V. L., Dawson, T. M., and Snyder, S. H. (1994). Nitric oxide activation of poly(ADP-ribose) synthetase in neurotoxicity. *Science* 263, 687-689.
- Zhang, J., and Zhong, Q. (2014). Histone deacetylase inhibitors and cell death. *Cell Mol Life Sci* 71, 3885-3901.
- Zhang, X., Yan, H., Yuan, Y., Gao, J., Shen, Z., Cheng, Y., Shen, Y., Wang, R. R., Wang, X., Hu, W. W., *et al.* (2013). Cerebral ischemia-reperfusion-induced autophagy protects against neuronal injury by mitochondrial clearance. *Autophagy* 9, 1321-1333.
- Zhang, Z. G., Chopp, M., Bailey, F., and Malinski, T. (1995). Nitric oxide changes in the rat brain after transient middle cerebral artery occlusion. *J Neurol Sci* 128, 22-27.
- Zhao, L. P., Ji, C., Lu, P. H., Li, C., Xu, B., and Gao, H. (2013). Oxygen glucose deprivation (OGD)/re-oxygenation-induced in vitro neuronal cell death involves mitochondrial cyclophilin-D/P53 signaling axis. *Neurochem Res* 38, 705-713.
- Zhaorigetu, S., Wan, G., Kaini, R., Jiang, Z., and Hu, C. A. (2008). ApoL1, a BH3-only lipid-binding protein, induces autophagic cell death. *Autophagy* 4, 1079-1082.
- Zhaorigetu, S., Yang, Z., Toma, I., McCaffrey, T. A., and Hu, C. A. (2011). Apolipoprotein L6, induced in atherosclerotic lesions, promotes apoptosis and blocks Beclin 1-dependent autophagy in atherosclerotic cells. *J Biol Chem* 286, 27389-27398.







IX. Anexo



# Apolipoprotein L2 contains a BH3-like domain but it does not behave as a BH3-only protein

J Galindo-Moreno<sup>1</sup>, R Iurlaro<sup>1</sup>, N El Mjiyad<sup>1</sup>, J Díez-Pérez<sup>2,3</sup>, T Gabaldón<sup>2,3,4</sup> and C Muñoz-Pinedo<sup>\*1</sup>

Apolipoproteins of the L family are lipid-binding proteins whose function is largely unknown. Apolipoprotein L1 and apolipoprotein L6 have been recently described as novel pro-death BH3-only proteins that are also capable of regulating autophagy. In an in-silico screening to discover novel putative BH3-only proteins, we identified yet another member of the apolipoprotein L family, apolipoprotein L2 (ApoL2), as a BH3 motif-containing protein. ApoL2 has been suggested to behave as a BH3-only protein and mediate cell death induced by interferon-gamma or viral infection. As previously described, we observed that ApoL2 protein was induced by interferon-gamma. However, knocking down its expression in HeLa cells did not regulate cell death induced by interferon-gamma. Overexpression of ApoL2 did not induce cell death on its own. ApoL2 did not sensitize or protect cells from overexpression of the BH3-only proteins Bmf or Noxa. Furthermore, siRNA against ApoL2 did not alter sensitivity to a variety of death stimuli. We could, however, detect a weak interaction between ApoL2 and Bcl-2 by immunoprecipitation of the former, suggesting a role of ApoL2 in a Bcl-2-regulated process like autophagy. However, in contrast to what has been described about its homologs ApoL1 and ApoL6, ApoL2 did not regulate autophagy. Thus, the role, if any, of ApoL2 in cell death remains to be clarified.

*Cell Death and Disease* (2014) 5, e1275; doi:10.1038/cddis.2014.237; published online 5 June 2014

**Subject Category:** Immunity

Bcl-2 family proteins regulate mitochondrial permeability to control apoptosis. These proteins induce or inhibit cell death, and they are associated with a growing number of pathologies, including cancer and immune diseases.<sup>1,2</sup> For this reason, the search of new members of this family is of crucial importance. A subfamily of Bcl-2 homologs termed 'BH3-only proteins' comprises a growing number of proteins that only share a small motif of 15–21 amino acid residues.<sup>3,4</sup> This region, known as the 'BH3-domain', is essential for the apoptotic function of Bcl-2 family proteins. The homology in this region is relatively loose, and only a few residues are conserved among the members of the family. For this reason, BH3-only proteins have been identified by functional means rather than by sequence homology.

To identify novel BH3-only proteins we used a bioinformatics approach known as profile-based homology search. In brief, we constructed a so-called Hidden Markov Model (HMM) of the BH3-domain from the alignment of a set of proteins known to bear this domain. This HMM describes the probabilities of finding a given amino acid at a given position of the domain. This probabilistic model is then used to search in a sequence database for proteins that are likely to encode the same domain.

One of the proteins identified by this method was the apolipoprotein L2 (ApoL2). Two other members of this family, ApoL1 and ApoL6 have been described to behave as

proapoptotic BH3-only proteins.<sup>5–7</sup> Although the functions of these proteins are still unclear, proteins of this family have been shown to bind lipids and they have been suggested to work as pore-forming proteins in intracellular membranes, based on the ability of ApoL1 to form pores in the lysosomal membrane of trypanosomes.<sup>8,9</sup> ApoL2 is highly homologous to ApoL1, and its BH3-like domain is very similar to those of ApoL1 and ApoL6. For these reasons, we explored the function of ApoL2 as a putative new BH3-only protein.

## Results

**Identification of novel BH3-containing proteins by using a profile-based homology search.** Profile-based searches with profiles of BH3 domains as defined in ProSite<sup>10</sup> and PFAM,<sup>11</sup> as well as regular expression searches with motifs defined in the literature failed to provide satisfactory results in terms of specificity and sensitivity of detecting known human BH3 proteins (Table 1). Therefore, to efficiently identify novel putative BH3-only proteins, we collected the sequences of all human and mouse BH3 motifs annotated in Uniprot as well as those described in the literature, and aligned them to subsequently build an HMM for the BH3-domain (see Materials and Methods) (Figure 1a). This HMM provided better results in finding known BH3 than existing profiles at Pfam (Table 1), and was therefore used to search for

<sup>1</sup>Cell Death Regulation Group, IDIBELL (Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge), Gran Via de L'Hospitalet 199, L'Hospitalet, 08908 Barcelona, Spain;

<sup>2</sup>Comparative Genomics Group, Centre for Genomics Regulation, Dr. Aiguader, 88, 08003 Barcelona, Spain; <sup>3</sup>Universitat Pompeu Fabra (UPF), 08003 Barcelona, Spain and <sup>4</sup>Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats (ICREA), Pg. Lluís Companys 23, 08010 Barcelona, Spain

\*Corresponding author: C Muñoz-Pinedo, IDIBELL – Hospital Duran i Reynals 3a planta, Gran Via de L'Hospitalet 199, L'Hospitalet, 08908 Barcelona, Spain. Tel: +34 93 260 7130; Fax: +34 93 260 7426; E-mail: cmunoz@idibell.cat

**Keywords:** apolipoproteins L; Bcl-2 family proteins; BH3-only; interferon-gamma; autophagy

**Abbreviations:** ApoL, apolipoprotein L; FBS, fetal bovine serum; IFN- $\gamma$ , interferon-gamma; TNF, tumor necrosis factor

Received 22.1.14; revised 14.4.14; accepted 22.4.14; Edited by G Melino

putative novel BH3-containing proteins in the human proteome and genome.

Our screening identified BFK, a known Bcl-2 homolog originally left out from the list of proteins used to build the model,<sup>12</sup> and PXT1, a protein that has been recently described as a BH3-only protein that kills HeLa cells in a manner dependent of its BH3 motif<sup>13</sup> (Table 2). Another protein identified by this screening was the apolipoprotein L2 protein (Figure 1b, Table 2). Two apolipoproteins of the L family, ApoL1 and ApoL6, have been previously identified as BH3-only proteins.<sup>5–7</sup> ApoL2, due to its homology with ApoL1 and ApoL6 has indeed been proposed to be a BH3-only protein.<sup>14</sup> ApoL2 mRNA is ubiquitously expressed, according

**Table 1** Summary of the results obtained from direct motif searches in the human proteome when using different strategies

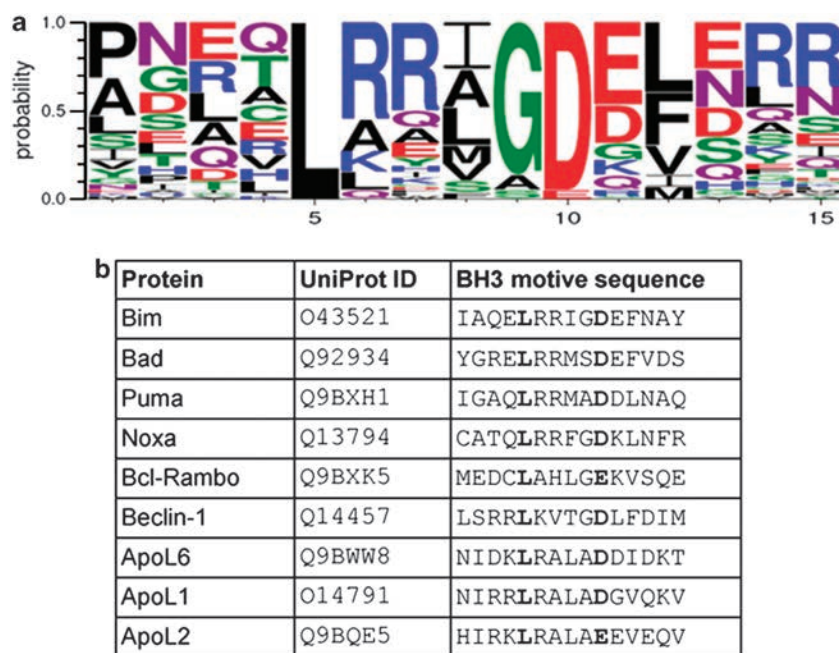
Motif search	Hits in human proteome	Known BCL's (TP)	Sensitivity (TP/TP + FN)
1. Youle <i>et al.</i> <sup>4</sup>	5908	13	68.4%
2. Liu <i>et al.</i> <sup>7</sup>	152	16	84.2%
3. Prosite	28	9	47.36%
4. Novel HMM	26	19	100%

First column indicates the search strategy: using a direct search with (1) The consensus BH3 motif (LXXXGD) as defined in Youle *et al.*<sup>4</sup> (2) The extended motif (LXXX[GAS][DE]) used by Liu *et al.*<sup>7</sup> in their identification of ApoL6; (3) The motif defined by Prosite<sup>10</sup> as of December 2008; and (4) an HMM-based search with the profile derived in this work. The following columns indicate, respectively, the number of total hits in the human proteome (Ensembl42 version), the number of known Bcl-2 family members identified of a total of 19 human members described in Youle *et al.*<sup>4</sup> and Uniprot (2008), and, finally the sensitivity of the search as computed by dividing the total number of correctly identified Bcl-2 family members (TP) by the total number of known Bcl-2 family members (TP + FN = 19). TP and FN stand for True Positives and False Negatives, respectively

to the database IST Online (Supplementary Figure 1). We checked that this protein is expressed in a variety of cell lines of different origins (Figure 2a), and highly expressed in HeLa cervical cancer cell line, as predicted due to its high expression in cervical cancer.<sup>15</sup> ApoL2 is localized in HeLa cells outside the nucleus in a punctate state (Figure 2b) and it is not secreted (Figure 2c). Although it had been predicted to interact with membranes,<sup>16</sup> we observed that it did not colocalize with mitochondrial, endoplasmic reticulum or lysosomal markers (Figure 2b).

ApoL2 is transcriptionally induced by interferon-gamma in a number of non-transformed tissues.<sup>14</sup> In human bronchial epithelial cells its downregulation sensitized cells to cell death induced by IFN- $\gamma$ , indicating that ApoL2 is an antiapoptotic protein in this context.<sup>14</sup> We observed that in HeLa cells IFN- $\gamma$  induces ApoL2 (Figure 2d). However, when we downregulated ApoL2 using two different silencing sequences, we could not observe sensitization to cell death (Figure 2e).

**ApoL2 is not a proapoptotic BH3-only protein.** To check whether ApoL2 behaves as a proapoptotic Bcl-2 family member, we overexpressed ApoL2 in HeLa cells. Overexpression was confirmed by immunofluorescence (Supplementary Figure 2) and western blot (Supplementary Figure 3). We used Noxa and Bmf as proapoptotic BH3-only proteins, and verified that these proteins killed HeLa cells (Figure 3a). However, ApoL2 did not. We observed a trend of lower background death in cells overexpressing ApoL2, suggesting that ApoL2 is an antiapoptotic Bcl-2 family protein. To test this we overexpressed ApoL2 in combination with Noxa or Bmf. Our results indicate that ApoL2 confers a minor protection from Noxa (Figure 3a). However, this did not



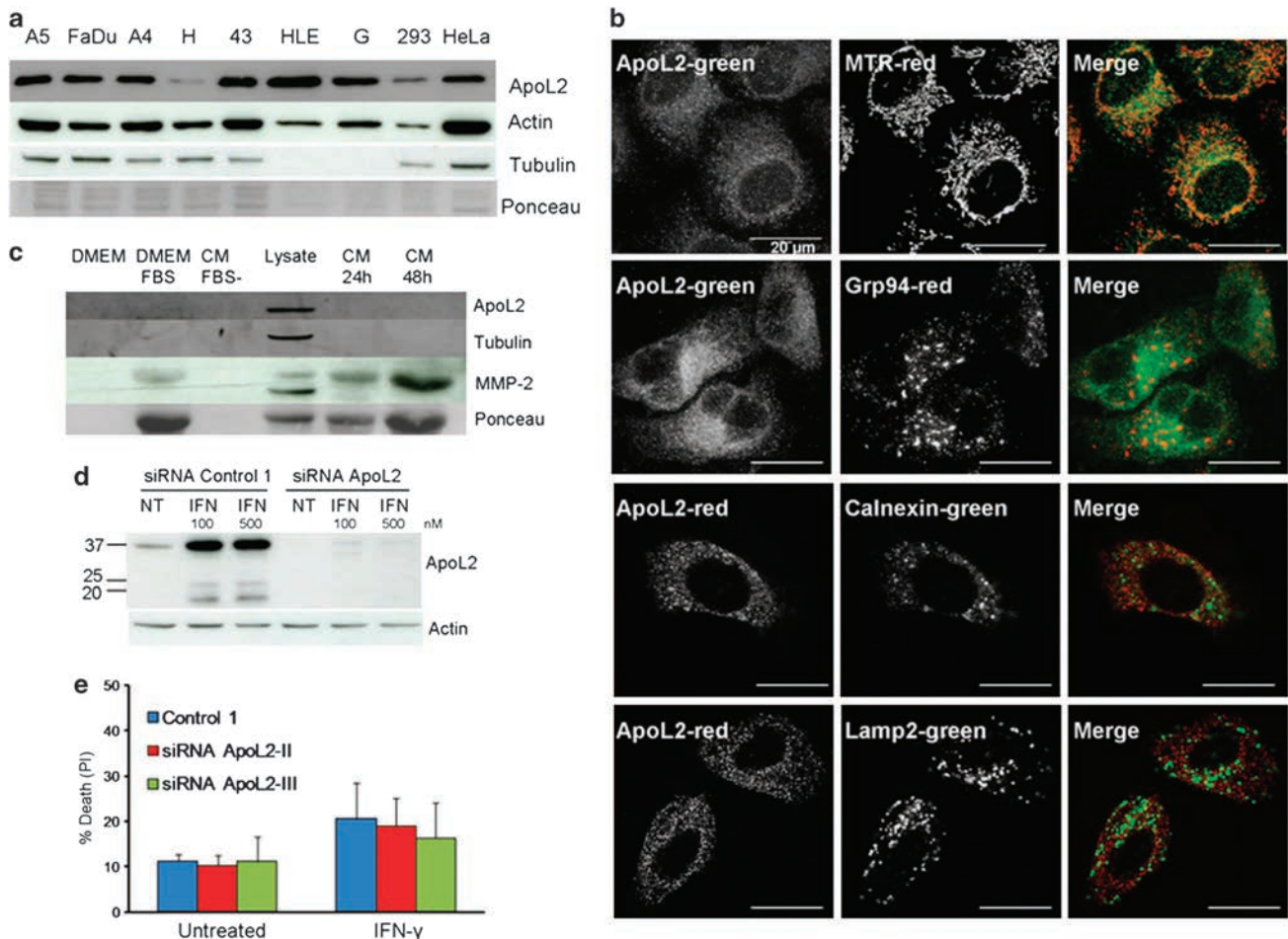
**Figure 1** ApoL2 contains a BH3-like motif. (a) Logo representation of the protein profile used in the search for new BH3-domain proteins. The logo indicates the probability of finding a given amino acid at each of the 15 positions of the BH3-domain. Amino acids are represented by the one-letter code, and their height is proportional to the probability of appearing at a given position in the BH3-domain. (b) Alignment of ApoL2 BH3 motif with other BH3 motifs



**Table 2** Summary of the putative BH3-only proteins predicted using HMM

Name	UniProt ID	NM ID	Amino acid number	Ensembl ID
Apolipoprotein L2 (ApoL2)	Q9BQE5	NM_030882.2 and NM_145637.1	337	ENSG00000128335
Arf-GAP with coiled-coil, ANK repeat and PH domain-containing protein 3 (ACAP3)	Q96P50	NM_030649.2	834	ENSG00000131584
GDP-fucose protein O-fucosyltransferase 2 (POFUT2)	Q9Y2G5	NM_015227.4	429	ENSG00000186866
Phenylalanine-4-hydroxylase (PHA)	P00439	NM_000277.1	452	ENSG00000171759
Peroxisomal testis-specific protein 1 (PXT1)	J3KR74	NM_152990.3	134	ENSG00000179165
Uncharacterized protein C19orf55 (C19orf55)	Q2NL68	NM_001039887	480 (putative)	ENSG00000167595

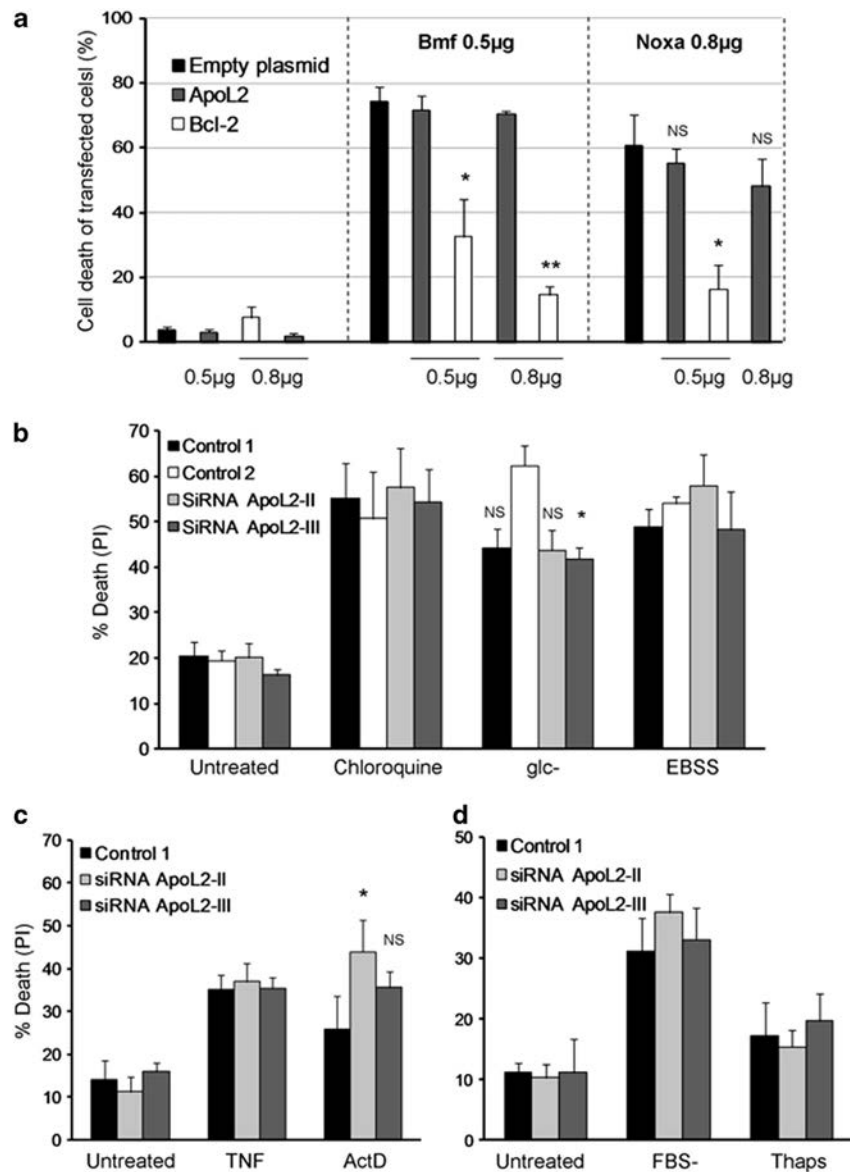
The table shows the different identification codes of the gene from the major databases. Uniprot ID (<http://www.uniprot.org/>), NM ID (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) and Ensembl ID (<http://www.ensembl.org/>) as well as the number of amino acids of the protein



**Figure 2** Cytosolic ApoL2 is widely expressed in different cell lines and induced by interferon-gamma. (a) ApoL2 expression was tested in different cell lines by western blot: A549 (A5), FaDu, A-431 (A4), HCT116 (H), 435P (43), HLE, HepG2 (G), HEK293 (293) and HeLa cells. (b) Intracellular localization of ApoL2. HeLa cells were stained with MitoTracker red (MTR) as mitochondrial marker. Antibodies against Grp94 and Calnexin were used as endoplasmic reticulum markers. Lysosomal localization was studied using Lamp-2 antibody. Scale bars of 20 μm are shown. (c) ApoL2 is not secreted. Western blot of trichloroacetic acid (TCA)-concentrated medium or cell lysate is shown. DMEM and DMEM complemented with FBS were used as controls. CM FBS – : conditioned medium of HeLa cells grown for 48 h in DMEM without FBS. Lysate: cell lysate of HeLa cells grown in FBS containing medium for 48 h. CM: conditioned medium of HeLa cells grown in FBS containing medium for indicated times. Antibodies against ApoL2, tubulin, actin and the secreted protein metalloproteinase-2 (MMP-2) were used for immunoblotting. (d) HeLa cells were transfected with siRNA ApoL2-II, treated with interferon-gamma (IFN) at 100 or 500 nM for 24 h and collected for western blot. NT means non treated. (e) HeLa cells were transfected with siRNA control 1 or siRNA against ApoL2 and treated with IFN-γ 100 nM for 72 h. Cell death was measured by PI incorporation at the flow cytometer. Figure shows average and S.E.M. of three independent experiments

reach statistical significance ( $n = 3$ ). Bcl-2 was employed as a control (expression checked in Supplementary Figure 3) and it protected from Noxa and Bmf.

Next we analyzed whether ApoL2 would regulate cell death induced by a variety of stimuli, either by behaving as an antiapoptotic protein as described<sup>14</sup> or as a proapoptotic



**Figure 3** ApoL2 does not regulate cell death of HeLa cells. (a) Plasmids encoding two different BH3-only proteins (0.5  $\mu$ g of Bmf and 0.8  $\mu$ g of Noxa plasmids) were cotransfected with ApoL2 or Bcl-2 and analyzed by microscopy. GFP (0.3  $\mu$ g) was used as transfection marker. ApoL2 and Bcl-2 plasmids were used at amounts shown. Empty plasmid was used to normalize the amount of transfected DNA. Dead green cells were scored by shrunk morphology and counted from images using fluorescence microscopy. Figure shows average and S.E.M. of three experiments. For statistical analysis, each ApoL2 or Bcl-2 overexpressing condition has been compared with the empty plasmid condition transfected with the same BH3-only protein. NS, nonsignificant. (b, c, d). HeLa cells were transfected with different control siRNAs or siRNA against ApoL2 and then treated with chloroquine, deprived of glucose (glc -), incubated in starvation buffer (EBSS) or treated with tumor necrosis factor (TNF) or actinomycin D (ActD) for 24 h (b, c), or deprived of serum (FBS -) or treated with thapsigargin (Thaps) for 72 h (d). Cell death was measured by PI incorporation by flow cytometry. Figure shows average and S.E.M. of three (d) or five experiments (b, c). Asterisks or NS (nonsignificant) denote significance versus Control 2 (b) or Control 1 (c)

BH3-only protein like ApoL1 and ApoL6. We knocked down ApoL2 using different siRNA sequences and treated HeLa cells with the endoplasmic reticulum stressor thapsigargin, the DNA damaging agent actinomycin D, the lysosomal inhibitor chloroquine, or starvation of serum, glucose or serum/amino acid/vitamins (culture in EBSS buffer) (Figures 3b–d). We only observed a minor difference in cell death induced by actinomycin D that was significant when cells were depleted of ApoL2 using one siRNA oligo but not the second one. ApoL2 has been shown to be induced by TNF.<sup>6</sup> We did not observe induction of ApoL2 upon TNF treatment in HeLa or

293T cells (Supplementary Figure 4). In addition, we treated HeLa cells with TNF in the presence of cycloheximide to induce cell death, and we did not observe any difference when ApoL2 was silenced (Figure 3c).

**ApoL2 interacts weakly with Bcl-2 but it does not regulate autophagy.** We could not detect a role of ApoL2 in cell death. However, not all BH3-only proteins described to date regulate cell death. Some proteins like Beclin-1 regulate autophagy through its interaction with Bcl-2 family proteins. ApoL6, which induces cell death and inhibits autophagy, has

been shown to bind Bcl-xL.<sup>17</sup> We thus tested whether endogenous ApoL2 interacted with other BH3-containing proteins. We immunoprecipitated ApoL2 and blotted for multidomain Bcl-2 family proteins. Bcl-2 was reproducibly immunoprecipitated with ApoL2 (Figure 4a). We were unable to immunoprecipitate endogenous Bcl-2 under the same conditions (not shown). For these reasons, to confirm these interactions in a different manner we overexpressed HA-tagged Bcl-2.<sup>18</sup> Under these conditions, we were unable to immunoprecipitate ApoL2 with anti-HA antibody (Figure 4b) or to detect HA upon immunoprecipitation of ApoL2, neither in HeLa nor in 293T cells (not shown). We next checked whether the weak interaction between ApoL2 and Bcl-2 (detected only using endogenous proteins) would alter the sensitivity of HeLa cells to the Bcl-2 and Bcl-xL inhibitor ABT-737. Downregulation of ApoL2 did not alter the amount of cell death induced by ABT-737 (Figure 5a).

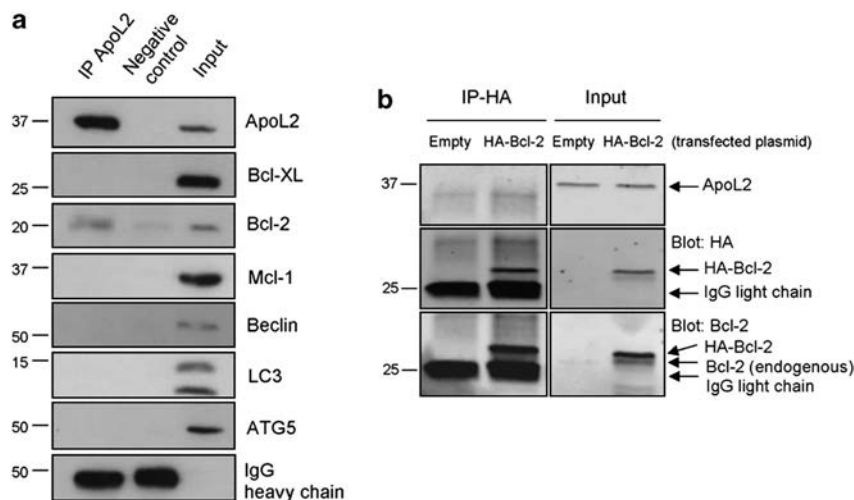
One possibility is that ApoL2, by interacting with Bcl-2 or signaling lipids, would regulate cell proliferation. We tested this and could not observe any effects on cellular proliferation by downregulation of ApoL2 (Figure 5b). We next investigated whether ApoL2 could act like Beclin-1 or ApoL6 regulating autophagy.<sup>17</sup> We downregulated ApoL2 (Figures 6a and b) and measured basal autophagy (lipidation of LC3 and degradation of p62 in the presence or absence of protease inhibitors) and starvation-induced autophagy (same measurements after incubation in starvation buffer EBSS). Our results indicate that ApoL2 does not alter basal or starvation-induced autophagic flux as measured by levels of LC3-II (Figures 6a and c). We did observe a significant reduction of p62 levels after ApoL2 was downregulated, suggesting that this protein regulates basal autophagy (Figures 6a and d), but this was not accompanied by a difference in levels of LC3-II at these conditions (Figure 6c).

Altogether, our data indicate that ApoL2 is not a classical BH3-only protein, and its exact function in cell death by interferon treatment remains to be determined.

## Discussion

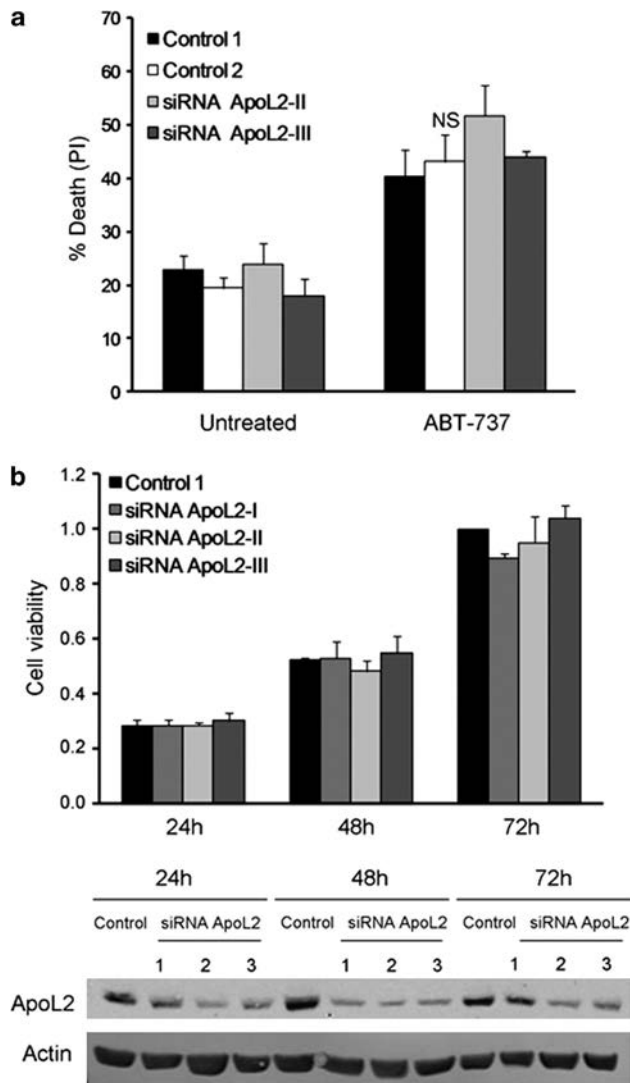
BH3-only proteins do not share a high degree of homology between them, and it is possible that the BH3-domain arose either randomly during evolution or by a process of convergent evolution.<sup>19</sup> Moreover, the BH3-domain is not extremely well conserved even among Bcl-2 family proteins that share more domains than the BH3.<sup>3</sup> Many BH3-only proteins have not been identified by sequence, but on the basis of their interaction with Bcl-2 family proteins. Other members of this family have been found to be proapoptotic proteins and the putative BH3-motif was identified later. We have performed here a search based on a newly-generated protein composition profile that was shown to identify all known BH3-only proteins plus few additional candidates in the human genome.

Our screening identified the protein PXT1, which has a BH3-like domain. This protein has been described to induce cytochrome c release and apoptosis in HeLa cells in a manner dependent on its BH3 motif.<sup>13</sup> In addition, apolipoprotein L2 (ApoL2) caught our attention due to the recent description of ApoL2 homologs as BH3-only proteins. ApoL1, the founding member of the family, was identified as a component of a class of high density lipoproteins (HDL) in human blood.<sup>20</sup> In subsequent years, a number of homologous proteins have been described: the apolipoprotein L family comprises six members in humans and 8–14 members in rodents.<sup>16,21</sup> ApoL1 is the only member of the family expected to be secreted, and when internalized by trypanosomes it generates pores in their lysosomal membrane.<sup>8</sup> ApoL1 and ApoL6 also kill mammalian cells when overexpressed, and it has been proposed that all members of the family could share this ability with these two proteins.<sup>9</sup> Induction of cell death by ApoL1 and ApoL6 was prevented when their BH3 motif was deleted.<sup>5,7</sup> Both proteins bind lipids;<sup>5,7</sup> interestingly, ApoL1 binds cardiolipin which is a lipid required for permeabilization of liposomes by Bcl-2 family members.<sup>22</sup> ApoL6 binds Bcl-xL



**Figure 4** Immunoprecipitation of ApoL2 in HeLa cells. (a) Endogenous ApoL2 was immunoprecipitated (IP) and the presence of the indicated proteins was assayed by western blot. Blots from a single experiment representative of three independent experiments are shown. (b) HeLa cells were transfected with HA-Bcl-2 or empty vector. Anti-HA was used for immunoprecipitation and the presence of ApoL2, Bcl-2 and HA was assayed by western blot. Panel shown is representative of three independent experiments. Left and right panels were cropped from the same films





**Figure 5** ApoL2 does not regulate cell proliferation or sensitivity to ABT-737. (a) HeLa cells were transfected with control siRNA or siRNA targeting ApoL2 and then they were treated with the BH3 mimetic ABT-737 at 30  $\mu$ M for 24 h. Cell death was measured by PI incorporation and flow cytometry. Panel shows average and S.E.M. of five independent experiments. (b) HeLa cells were transfected with control 1 siRNA or siRNAs against ApoL2 and growth analysis was performed at indicated time points by crystal violet coloration. The lower panel shows western blot analysis of ApoL2 silencing over time

and it regulates autophagy.<sup>17</sup> So indeed, many similarities exist between some members of the apolipoprotein L family and 'classic' Bcl-2 family proteins.

ApoL2 has been shown to be antiapoptotic in primary cells treated with interferon-gamma.<sup>14</sup> Recently, ApoL2 has been identified as a protein that translocates to mitochondria in cells infected with H3N2 swine influenza virus.<sup>23</sup> These two facts, together with the description of other proteins of the family as BH3-only proteins has led to propose that ApoL2 has a role in apoptosis, which we have not been able to confirm. It is possible that the aspartic residue in position 10 of the motif (Figure 1) is essential for their proapoptotic function. The function of other Bcl-2 family members with a glutamic acid in that position, Bcl-Rambo (Bcl2L13) and Bcl-G (Bcl2L14), is

still not fully defined, but their main function may be unrelated to cell death.<sup>24,25</sup>

We have detected a weak interaction between Bcl-2 and ApoL2. However, this did not alter apoptosis induced by many stimuli or starvation-induced autophagy. We did observe a basal regulation of p62, an autophagic protein, which could suggest that this protein regulates autophagy under certain conditions due to its interaction with Bcl-2. On the other hand, Bcl-2 regulates multiple metabolic pathways,  $\text{Ca}^{2+}$  stores in the endoplasmic reticulum, mitochondrial morphology and DNA repair.<sup>26,27</sup> We have not explored here the possibility that ApoL2 regulates these functions of Bcl-2. Nonetheless, it is also possible that the ApoL2 has a cell-type or stimulus-dependent role on cell death that according to our data is not general or ubiquitous.

## Materials and Methods

**Building the HMM.** Sequences of vertebrate proteins annotated with the BH3-domain in Uniprot and the literature as of November 2008 (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w, Mcl-1, Bcl-Rambo, Bcl-G, Bax, Bak, Bok, Bim, Bid, Bad, Bmf, Noxa, Hrk, Puma, Bik, Blk, Mule, Spike, Nix, BNIP3, Map-1, Cul7, Beclin-1, p53, ApoL6, ApoL1 and AVEN) were aligned with MAFFT.<sup>28</sup> A 15-residue long region from the alignment containing the annotated BH3 domains was selected using trimAl 1.3,<sup>29</sup> and a HMM model was built for the region using HMMER v1.8.5.<sup>30</sup> HMMER was used to search in the entire human proteome, as retrieved from Ensembl database version 50.<sup>31</sup> To detect the domain in putative unannotated proteins we ran Exonerate<sup>32</sup> using that profile over the genome sequence. The results were compared with similar searches using the profiles available at PFAM (which rendered only already-annotated proteins) and Prosite databases, as well as with regular expression searches with motifs described in the literature (Table 1).

**Cell culture and treatments.** HeLa cells from American Type Culture Collection and 293T were cultured in pyruvate-free high glucose Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Gibco Life Technologies, Waltham, MA, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 200 mg/ml of penicillin, 100  $\mu$ g/ml of streptomycin and glutamine 2 mM (hereafter referred to as PSQ). Cells were maintained at 37 °C and in a 5%  $\text{CO}_2$  atmosphere. Cell maintenance is based on three splits per week using trypsin EDTA-Solution 0.05% (Invitrogen). HeLa cells were plated at a concentration of 150 000/ml in 6- or 12-well plates and treated 24 h later, when they reached the concentration of 500 000/ml. 293T cells were plated at a concentration of  $1 \times 10^6$ /ml in 10 cm plates for transfections.

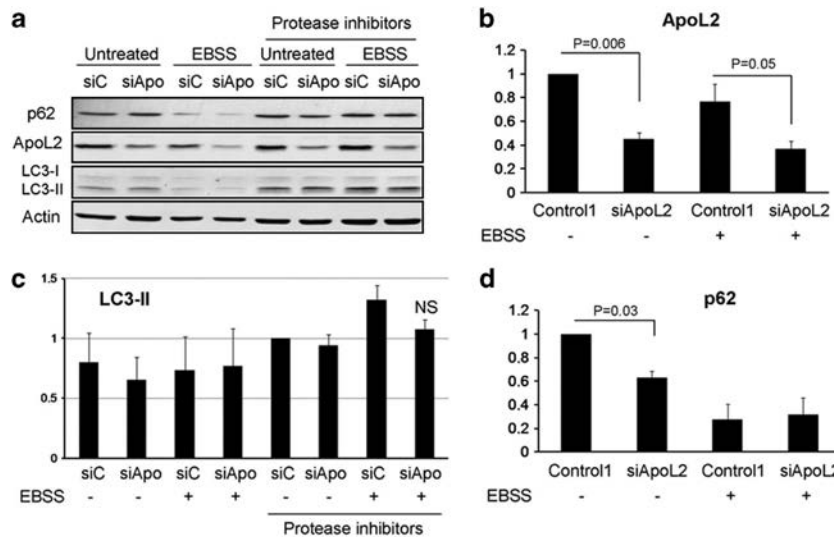
Before glucose-deprivation or FBS-deprivation treatments, cells were washed twice with FBS-free, pyruvate-free DMEM medium without glucose (Gibco Life Technologies) or high-glucose, FBS-free DMEM, respectively. Glucose-deprivation treatment is performed in PSQ-containing, glucose-free DMEM medium without glucose supplemented with 10% dialyzed FBS. FBS-deprivation treatment was performed in PSQ-containing high-glucose DMEM. For induction of cell death by starvation in Earle's Balanced Salt Solution (EBSS, Gibco Life Technologies), cells were washed twice with EBSS before treating with EBSS supplemented with Hepes 25 mM.

ABT-737 (Selleck Chemicals, Houston, TX, USA) is used at 30  $\mu$ M, chloroquine, thapsigargin and actinomycin D (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) at 100  $\mu$ M, 100  $\mu$ g/ml and 50 nM, respectively, interferon-gamma (Novus Bionova, Madrid, Spain) at 100 ng/ml. TNF- $\alpha$  (Peprotech, Le-Perray-en-Yvelines, France, 10 ng/ml) is added in combination with 10  $\mu$ M cycloheximide (Sigma-Aldrich) to induce cell death.

For autophagy induction, cells were incubated in home-made EBSS (potassium chloride 400 mg/ml, sodium bicarbonate 2.2 g/ml, sodium chloride 6.8 g/ml,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  140 mg/ml, D-Glucose 1 g/ml) supplemented with 25 mM Hepes. EBSS-Hepes treatment is performed after washing the cells twice with EBSS.

Autophagy flux was blocked by adding the protease inhibitors pepstatin A and E64d (Sigma, St. Louis, MO, USA, 10  $\mu$ M each) simultaneously with the treatments.

**Cell viability.** For analysis of viability, cells were harvested by combining floating cells in the medium and adherent cells detached by trypsinization, and subjected to FACS analysis to detect incorporation of propidium iodide 1  $\mu$ g/ml



**Figure 6** ApoL2 does not regulate autophagy. HeLa cells were transfected with siRNA Control 1 (labeled as siC) or siRNA against ApoL2-II (labeled as siApo) for 48 h and then the medium was changed or they were incubated with EBSS for 6 h to induce autophagy. The protease inhibitors pepstatin and E64D (10  $\mu$ M each) were used to block autophagic flux. A representative western blot is shown in **a**. ApoL2 levels were quantified and are shown in **b**: data were weighted to ponceau or actin and then normalized against Control 1-transfected untreated cells. **(c)** Quantification of relative LC3-II levels: data were weighted to ponceau or actin and then normalized against Control 1-transfected HeLa cells with protease inhibitors as control of basal autophagy. **(d)** Quantification of relative p62 levels: data were weighted to ponceau or actin and then normalized against Control 1-transfected untreated cells. Graphs show average and S.D. of three independent experiments

(10 min incubation in PBS) using Gallios Flow Cytometer Beckman Coulter. Data were analyzed using FlowJo software, version 7.6.4.

Cell viability and number was additionally measured by crystal violet coloration. After the indicated treatments, cells were covered with staining solution (0.2% crystal violet, 2% EtOH solution) and incubated for 20 min at room temperature. Cells were rinsed twice with PBS and once with water and let dry for 16 h. Crystal violet-stained cells were then resuspended in 10% SDS and absorbance was read at 595 nm in a BioTek (Winooski, VT, USA) PowerWave XS microplate spectrophotometer.

**Western blotting.** Cell pellets were resuspended in RIPA buffer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) or lysis buffer (0.06 M Tris, 2% SDS) containing protease inhibition cocktail (Roche, Basel, Switzerland) and phosphatase inhibitors (PhosSTOP, Roche) and they were then sonicated.

For trichloroacetic acid (TCA) precipitation, the acid (Merck, Darmstadt, Germany) was added to the sample at a final concentration of 13%, mixed thoroughly and incubated overnight at 4  $^{\circ}$ C under rotation. The mixture was centrifuged (16 000  $\times$  g, 15 min, 4  $^{\circ}$ C), and the supernatant was discarded. The pellet was resuspended in RIPA buffer.

Protein quantification was performed using Pierce BCA protein assay kit, following the manufacturer's instructions. 40  $\mu$ g of protein were diluted in 10  $\mu$ l of laemmli buffer 4  $\times$  (63 mM Tris-HCl, 10% glycerol, 2% SDS, 0.01% bromophenol blue and 5% 2-mercaptoethanol), and PBS was added until 40  $\mu$ l of total volume. Lysates were boiled for 10 min at 96  $^{\circ}$ C and loaded in a 12% acrylamide gel. Mini-protean (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) electrophoresis tank was used to perform the electrophoresis assay. Proteins were transferred to polyvinylidene fluoride (PVDF, Millipore, Darmstadt, Germany) or nitrocellulose membranes (Bio-Rad) through semi-dry transfer (1 h at 0.2 A/membrane). Transfer validation and loading charge control was checked by ponceau dye (Sigma). PVDF membranes were blocked with 5% nonfat dry milk in Tween Tris-buffered saline (TTBS) and processed for immunoluminescence. Nitrocellulose membranes were blocked with Odyssey Blocking Buffer (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA) and processed for immunofluorescence using Odyssey Fc Imaging system. Primary and secondary antibodies were incubated for 1 h at room temperature or overnight at 4  $^{\circ}$ C, in 5% milk TTBS. Three 10-min TTBS washes in the shaker were performed before developing by enhanced chemiluminescence (ECL; Pierce, Waltham, MA, USA) or scanning the membrane using Odyssey Imaging System. Quantification of band intensity was performed with Fiji/Image J software 1.47b.

Primary antibodies used for western blotting were: anti-actin (ICN clone 4), polyclonal anti-ApoL2 (Sigma, HPA001078), anti-tubulin (Sigma, Clone TUB 2.1), polyclonal antibody against p62 (Progen, Heidelberg, Germany), polyclonal

anti-LC3 (Abcam, Cambridge, UK), anti-HA (Sigma, clone HA-7), anti-Bcl-xL (Cell Signaling, Beverly, MA, USA, 54H6), anti-Bcl-2 (Santa Cruz, Dallas, TX, USA, 100), polyclonal anti-Mcl-1 (Santa Cruz, sc-819), polyclonal anti-Atg5 (CosmoBio, Tokyo, Japan), anti-beclin-1 (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA, 20/Beclin). HRP secondary antibodies were: antimouse and anti-rabbit (Zymax, Bideford, UK) or anti-guinea pig (Abcam). IRDye secondary anti-bodies against mouse or rabbit (IRDye 800CW donkey anti-rabbit IgG1 1/15.000 or IRDye 680LT anti-mouse IgG 1/20 000) were from LI-COR Biosciences.

**Plasmids and transient transfection.** ApoL2 cDNA (NM\_030882.2) was purchased from Origene and subcloned into ampicillin resistant pcDNA3.1 plasmid using EcoR1 and BamH1 restriction enzymes. Invitrogen PureLink kit was used to extract the plasmid from competent bacteria (Promega, Fitchburg, WI, USA).

For death experiments, HeLa cells were transfected in six-well plates, using 4  $\mu$ l of Genejuice (Novagen, Darmstadt, Germany) and 2  $\mu$ g of total DNA. To normalize until 2  $\mu$ g, we completed with the empty plasmid pcDNA 3.1. pcDNA 3.1-Bcl-2 plasmid was generously provided by Dr. Jean-Ehrland Ricci (Nice, France). HA-Noxa and pcDNA 3.1-Bmf were provided by Professor Seamus Martin (Dublin, Ireland). pcDNA 3.1-HA-Bcl-2 and pcDNA 3.1-HA-Bcl-xL plasmids from Dr. Douglas Green's laboratory (Memphis, TN, USA) were used in the immunoprecipitation assay. Cell death was analyzed by counting GFP positive dead cells against total GFP positive cells using an Olympus IX70 inverted microscope. For immunoprecipitation, HeLa cells were transfected in 10 cm dishes, using 3  $\mu$ g of polyethylenimine linear (PEI; Polysciences Europe, Heidelberg, Germany) per  $\mu$ g of DNA. Cotransfection was performed using 10  $\mu$ g of ApoL2 and 10  $\mu$ g of HA-Bcl-xL or HA-Bcl-2 plasmid.

**siRNA transfection.** Cells were transfected at a density of 300 000/ml using 1.5  $\mu$ l of DharmaFECT 1 (Dharmacon, Lafayette, CO, USA) per milliliter of total volume and following manufacturer's instructions. siRNA concentration was 100 nM. After 24 h, medium was replaced with growth medium. Control sequences were: 5'-GUAAGACACGACUUAUCGC[dT][dT] ('control 1') and an ON-TARGET plus siRNA pool of 4 oligos against mouse RIPK (Dharmacon; 'control 2'). Three different siRNA sequences were used against ApoL2: ApoL2-I (GCGGCAC CAAUGUAGCAAA[dT][dT]), ApoL2-II (CAGUGUGGUAAGACUAGUA[dT][dT]) and ApoL2-III (CAAUGUUCUUAACCUAGUU[dT][dT]).

**Immunofluorescence.** Cells were cultured on glass coverslips pretreated with poly-L-Lysine (Sigma). After 24 h they were incubated for 15 min in culture medium at 37  $^{\circ}$ C and 5% CO<sub>2</sub> with MitoTracker red 200 nM (Invitrogen) before

fixing, or they were directly fixed with a fresh 4% solution of paraformaldehyde for 20 min. Cells were then incubated with blocking buffer: 0.05% Triton, 3% BSA in PBS for 1 h and kept overnight at 4 °C with primary antibodies diluted 1:200 in blocking buffer: Ab rabbit anti-ApoL2 (Sigma), mouse anti-Lamp-2 (BD pharmigen, Franklin Lakes, NJ, USA, CD107b, 555803), mouse anti-Calnexin (Santa Cruz, E-10, sc-46669), goat anti-GRP94 (Santa Cruz, C-19, sc-1794). Cells were incubated with secondary antibodies Alexa Fluor 568 red and 488 green (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) diluted 1:400 in blocking buffer for 1 h. Then they were mounted in Vectashield solution (Vector laboratories, Burlingame, CA, USA) on microscope slides and visualized on a Leica TCS SP5 Spectral Confocal microscope with a HCX PL APO lambda blue  $\times 63$  1.4 oil objective lens. Acquisition software was LEICA (Wetzlar, Germany) Application Suite Advanced Fluorescence (LAS AF) version 2.6.0.7266 and pictures were analyzed with Fiji/Image J software.

**Immunoprecipitation.** A total of 30  $\mu$ l of Protein G Magnetic Beads (Millipore) were washed 3  $\times$  in immunoprecipitation buffer and then incubated in 1 ml of immunoprecipitation buffer with 1  $\mu$ g of antibody for 4 h at 4 °C under rotation.  $10 \times 10^6$  cells were lysed in 500  $\mu$ l of immunoprecipitation buffer (20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 137 mM NaCl, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA (pH 8)) containing complete protease inhibitor cocktail and incubated for 30 min in ice. A total of 1400  $\mu$ g of cell extract were incubated overnight in 1 ml of immunoprecipitation buffer with the antibody-coupled beads. The next day, beads were washed five times with immunoprecipitation buffer and eluted with 60  $\mu$ l of immunoprecipitation buffer containing 2% SDS. Then 20  $\mu$ l of laemmli buffer 4  $\times$  were added, and samples were boiled for 10 min at 95 °C. Eluted proteins were split in two gels of SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Ten percent of the total protein subjected to immunoprecipitation was loaded as input and 30  $\mu$ l of the remaining supernatant after immunoprecipitation was also loaded to confirm immunodepletion. A total of 1  $\mu$ g of anti-HA and anti-ApoL2 described above were used for immunoprecipitation.

**Statistics.** Error bars in the figures represent the standard error of the mean (S.E.M.). Data were statistically analyzed to find significant differences using two-tailed, paired Student's *t*-test. Significant differences are marked in the figures with \* ( $P \leq 0.05$ ) or \*\* ( $P \leq 0.0005$ ).

## Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

**Acknowledgements.** We wish to thank Dorothee Walter, Silvia Ramirez-Peinado, Didac Dominguez and Clara León-Annicchiarico for help with experiments and Jean-Ehrlend Ricci, Seamus Martin, Giulio Donati, Albert Tauler, Oscar M Tirado, Fabien Llambi, Pat Fitzgerald and Doug Green for plasmids, reagents and/or advice. This work was supported by the Association for International Cancer Research (AICR), grant number 08-0621 and Fondo de Investigaciones Sanitarias of Spain, grant numbers PI10/00104 and PI13/00139.

1. Droin NM, Green DR. Role of Bcl-2 family members in immunity and disease. *Biochim Biophys Acta* 2004; **1644**: 179–188.
2. Frenzel A, Grespi F, Chmielewski W, Villunger A. Bcl2 family proteins in carcinogenesis and the treatment of cancer. *Apoptosis* 2009; **14**: 584–596.
3. Lomonosova E, Chinnadurai G. BH3-only proteins in apoptosis and beyond: an overview. *Oncogene* 2008; **27**: S2–S19.
4. Youle RJ, Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; **9**: 47–59.
5. Wan G, Zhaorigetu S, Liu Z, Kaini R, Jiang Z, Hu CA. Apolipoprotein L1, a novel Bcl-2 homology domain 3-only lipid-binding protein, induces autophagic cell death. *J Biol Chem* 2008; **283**: 21540–21549.
6. Zhaorigetu S, Wan G, Kaini R, Jiang Z, Hu CA. ApoL1, a BH3-only lipid-binding protein, induces autophagic cell death. *Autophagy* 2008; **4**: 1079–1082.
7. Liu Z, Lu H, Jiang Z, Pastuszyn A, Hu CA. Apolipoprotein L6, a novel proapoptotic Bcl-2 homology 3-only protein, induces mitochondria-mediated apoptosis in cancer cells. *Mol Cancer Res* 2005; **3**: 21–31.
8. Perez-Morga D, Vanhollenbeke B, Paturiaux-Hanocq F, Nolan DP, Lins L, Hombel F et al. Apolipoprotein L-I promotes trypanosome lysis by forming pores in lysosomal membranes. *Science* 2005; **309**: 469–472.

9. Vanhollenbeke B, Pays E. The function of apolipoproteins L. *Cell Mol Life Sci* 2006; **63**: 1937–1944.
10. Sigrist CJA, de Castro E, Cerutti L, Cuche BA, Hulo N, Bridge A et al. New and continuing developments at PROSITE. *Nucleic Acids Res* 2013; **41**: D344–D347.
11. Finn RD, Bateman A, Clements J, Coghill P, Eberhardt RY, Eddy SR et al. Pfam: the protein families database. *Nucleic Acids Res* 2014; **42**: D222–D230.
12. Coultas L, Pellegrini M, Visvader JE, Lindeman GJ, Chen L, Adams JM et al. Bfk: a novel weakly proapoptotic member of the Bcl-2 protein family with a BH3 and a BH2 region. *Cell Death Differ* 2003; **10**: 185–192.
13. Kaczmarek K, Studencka M, Meinhardt A, Wiecekzak K, Thoms S, Engel W et al. Overexpression of peroxisomal testis specific 1 protein induces germ cell apoptosis and leads to infertility in male mice. *Mol Biol Cell* 2011; **22**: 1766–1779.
14. Liao W, Goh FY, Betts RJ, Kemeny DM, Tam J, Bay BH et al. A novel anti-apoptotic role for apolipoprotein L2 in IFN-gamma-induced cytotoxicity in human bronchial epithelial cells. *J Cell Physiol* 2011; **226**: 397–406.
15. Ahn WS, Bae SM, Lee JM, Namkoong SE, Han S-J, Cho YL et al. Searching for pathogenic gene functions to cervical cancer. *Gynecol Oncol* 2004; **93**: 41–48.
16. Page NM, Butlin DJ, Lomthaisong K, Lowry PJ. The human apolipoprotein L gene cluster: identification, classification, and sites of distribution. *Genomics* 2001; **74**: 71–78.
17. Zhaorigetu S, Yang Z, Toma I, McCaffrey TA, Hu CA. Apolipoprotein L6, induced in atherosclerotic lesions, promotes apoptosis and blocks Bcl-1-dependent autophagy in atherosclerotic cells. *J Biol Chem* 2011; **286**: 27389–27398.
18. Llambi F, Moldoveanu T, Tait SW, Bouchier-Hayes L, Temirov J, McCormick LL et al. A unified model of mammalian BCL-2 protein family interactions at the mitochondria. *Mol Cell* 2011; **44**: 517–531.
19. Aouacheria A, Brunet F, Gouy M. Phylogenomics of life-or-death switches in multicellular animals: Bcl-2, BH3-only, and BNIP families of apoptotic regulators. *Mol Biol Evol* 2005; **22**: 2395–2416.
20. Duchateau PN, Pullinger CR, Orellana RE, Kunitake ST, Naya-Vigne J, O'Connor PM et al. Apolipoprotein L, a new human high density lipoprotein apolipoprotein expressed by the pancreas. Identification, cloning, characterization, and plasma distribution of apolipoprotein L. *J Biol Chem* 1997; **272**: 25576–25582.
21. Monajemi H, Fontijn RD, Pannekoek H, Horrevoets AJ. The apolipoprotein L gene cluster has emerged recently in evolution and is expressed in human vascular tissue. *Genomics* 2002; **79**: 539–546.
22. Kuwana T, Mackey MR, Perkins G, Ellisman MH, Latterich M, Schneider R et al. Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell* 2002; **111**: 331–342.
23. Wu X, Wang H, Bai L, Yu Y, Sun Z, Yan Y et al. Mitochondrial proteomic analysis of human host cells infected with H3N2 swine influenza virus. *J Proteomics* 2013; **91**: 136–150.
24. Tischner D, Villunger A. Bcl-G acquitted of murder! *Cell Death Dis* 2012; **3**: e405.
25. Giam M, Okamoto T, Minter JD, Strasser A, Bouillet P. Bcl-2 family member Bcl-G is not a proapoptotic protein. *Cell Death Dis* 2012; **3**: e404.
26. Hetz C, Glimcher L. The daily job of night killers: alternative roles of the BCL-2 family in organelle physiology. *Trends Cell Biol* 2008; **18**: 38–44.
27. Laulier C, Lopez BS. The secret life of Bcl-2: apoptosis-independent inhibition of DNA repair by Bcl-2 family members. *Mutat Res* 2012; **751**: 247–257.
28. Russell DJ, Katoh K, Standley D. MAFFT: iterative refinement and additional methods. In: *Multiple Sequence Alignment Methods*. Humana Press: Suva, Japan, 2014, pp 131–146.
29. Capella-Gutiérrez S, Silla-Martínez JM, Gabaldón T. trimAl: a tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses. *Bioinformatics* 2009; **25**: 1972–1973.
30. Eddy SR. Accelerated profile HMM searches. *PLoS Comput Biol* 2011; **7**: e1002195.
31. Flicek P, Amodé MR, Barrell D, Beal K, Billis K, Brent S et al. Ensembl 2014. *Nucleic Acids Res* 2014; **42**: D749–D755.
32. Slater GS, Birney E. Automated generation of heuristics for biological sequence comparison. *BMC Bioinformatics* 2005; **6**: 31.



**Cell Death and Disease** is an open-access journal published by Nature Publishing Group. This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0 Unported License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>

Supplementary Information accompanies this paper on Cell Death and Disease website (<http://www.nature.com/cddis>)







# Analysis of BH3-only proteins upregulated in response to oxygen/glucose deprivation in cortical neurons identifies Bmf but not Noxa as potential mediator of neuronal injury

S Pfeiffer<sup>1</sup>, U Anilkumar<sup>1</sup>, G Chen<sup>1</sup>, S Ramírez-Peinado<sup>2,3</sup>, J Galindo-Moreno<sup>2</sup>, C Muñoz-Pinedo<sup>2</sup> and JH M Prehn<sup>\*1</sup>

Stress signaling in response to oxygen/glucose deprivation (OGD) and ischemic injury activates a group of pro-apoptotic genes, the Bcl-2 homology domain 3 (BH3)-only proteins, which are capable of activating the mitochondrial apoptosis pathway. Targeted studies previously identified the BH3-only proteins Puma, Bim and Bid to have a role in ischemic/hypoxic neuronal injury. We here investigated the transcriptional activation of pro-apoptotic BH3-only proteins after OGD-induced injury in murine neocortical neurons. We observed a potent and early upregulation of *noxa* at mRNA and protein level, and a significant increase in Bmf protein levels during OGD in neocortical neurons and in the ipsilateral cortex of mice subjected to transient middle cerebral artery occlusion (tMCAO). Surprisingly, gene deficiency in *noxa* reduced neither OGD- nor glutamate-induced neuronal injury in cortical neurons and failed to influence infarct size or neurological deficits after tMCAO. In contrast, *bmf* deficiency induced significant protection against OGD- or glutamate-induced injury in cultured neurons, and *bmf*-deficient mice showed reduced neurological deficits after tMCAO *in vivo*. Collectively, our data not only point to a role of Bmf as a BH3-only protein contributing to excitotoxic and ischemic neuronal injury but also demonstrate that the early and potent induction of *noxa* does not influence ischemic neuronal injury.

Cell Death and Disease (2014) 5, e1456; doi:10.1038/cddis.2014.426; published online 9 October 2014

Cerebral ischemia, resulting from occlusion or hemorrhaging of blood vessels supplying the brain, triggers a complex series of physiological, biochemical and gene expression changes ultimately mediating neuronal injury and activation of cell death mechanisms.<sup>1</sup> Outside of the damaged necrotic infarct core following focal cerebral ischemia, the ischemic penumbra presents an area of less severe neuronal injury, functionally impaired but structurally intact, with active cell death pathways contributing to neuronal injury and loss of neurological function over time.<sup>2</sup> Among pro-inflammatory and other processes, progressive neuronal injury of the ischemic penumbra is associated with glutamate-induced depolarization, energetic stress and activation of AMP-activated protein kinase (AMPK), with the later triggering both pro-survival and pro-apoptotic signaling in neurons.<sup>3,4</sup>

Mitochondrial-mediated apoptosis has been shown to be involved in neuronal cell death after cerebral ischemia in studies of both patient samples and animal models of acute stroke,<sup>5</sup> with reduced expression of anti-apoptotic Bcl-2 and Bcl-w and induction of pro-apoptotic Bax observed within the ischemic core and surrounding penumbra.<sup>6</sup> Translocation of cytosolic Bax to the mitochondrial outer membrane is key

for the activation of mitochondrial apoptosis in neurons.<sup>7–11</sup>

This process is inhibited by anti-apoptotic Bcl-2 family proteins,<sup>12–15</sup> and overexpression of anti-apoptotic Bcl-2 family proteins have demonstrated *in vivo* neuroprotective roles against ischemic neuronal cell death.<sup>15–17</sup> Bax translocation and membrane insertion eventually results in mitochondrial membrane permeabilization and the release of cytochrome *c* and other pro-apoptotic proteins that trigger caspase-dependent and -independent cell death processes.<sup>18,19</sup> Bax activation is triggered by the transcriptional and posttranslational activation of Bcl-2 homology domain 3 (BH3)-only proteins that directly activate Bax and/or indirectly activate Bax by neutralizing the activity of anti-apoptotic Bcl-2 family proteins ('de-repression').<sup>19–21</sup>

A role for several BH3-only proteins, in particular Bid,<sup>22,23</sup> and Puma,<sup>24</sup> in ischemic neuronal injury has been previously suggested in studies using animals deficient in these genes. Among the pro-apoptotic BH3-only proteins implicated in ischemic neuronal cell death, the roles of Bcl-2-modifying factor (Bmf) and Noxa remain poorly investigated.<sup>25</sup> Both are known to act as indirect activators of apoptosis with roles as 'de-repressors', preventing sequestration of direct activators

<sup>1</sup>Department of Physiology and Medical Physics, Royal College of Surgeons in Ireland, 123 St. Stephen's Green, Dublin 2, Ireland and <sup>2</sup>Cell Death Regulation Group, IDIBELL (Bellvitge Biomedical Research Institute), Gran Via de L'Hospitalet 199, Barcelona 08908, Spain

\*Corresponding author: JHM Prehn, Department of Physiology and Medical Physics and RCSI Neuroscience Research Centre, Centre for the Study of Neurological Disorders, Royal College of Surgeons in Ireland, 123 St. Stephen's Green, Dublin 2, Ireland. Tel: +353 1 402 2255; Fax: +353 1 402 2447; E-mail: prehn@rcsi.ie

<sup>3</sup>Current address: BioMedX GmbH, Im Neuenheimer Feld 583, Heidelberg 69120, Germany.

**Abbreviations:** AMPK, AMP-activated protein kinase; BH3, Bcl-2 homology domain 3; Bmf, Bcl-2-modifying factor; DIV, days *in vitro*; eGFP, enhanced green fluorescent protein; NMDA, N-methyl-D-aspartate; OGD, oxygen/glucose deprivation; PCA, posterior cerebral artery; PcomA, posterior communicating artery; qPCR, quantitative PCR; SCA, superior cerebellar artery; tMCAO, transient middle cerebral artery occlusion; WT, wild type

Received 02.5.14; revised 28.8.14; accepted 04.9.14; Edited by M Agostini

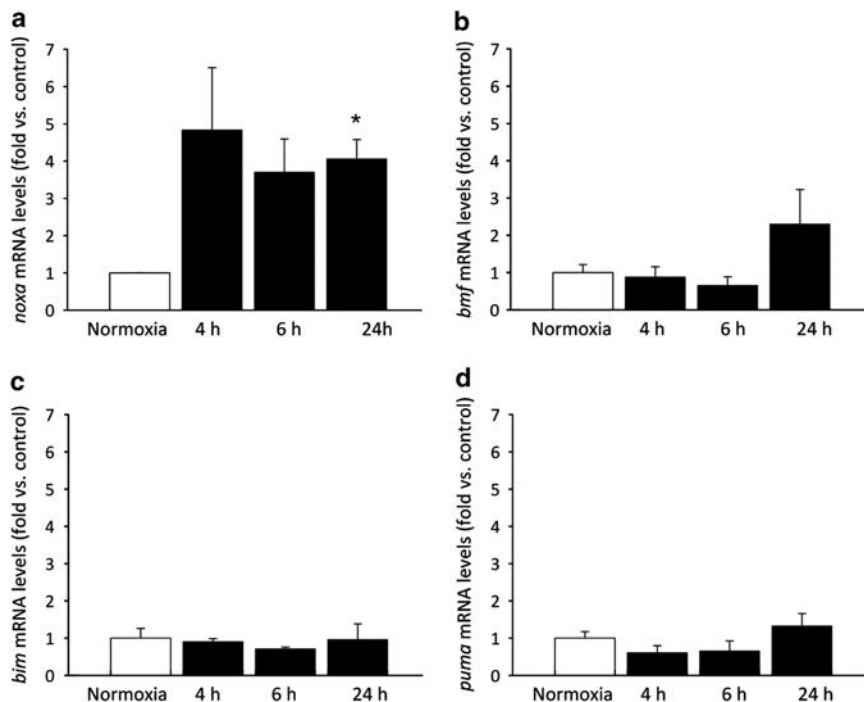
such as Puma, Bid and Bim by pro-survival Bcl-2 family with limited effect on cytochrome *c* release in cellular and isolated mitochondrial studies.<sup>20,26,27</sup> Bmf has been reported to have roles in cell death in response to anoikis through the inhibition of Bcl-2,<sup>28,29</sup> and has been shown to be induced under conditions of hypoxia and through c-jun N-terminal kinase (JNK) and AMPK activation in response to bioenergetic stress,<sup>30,31</sup> as well as having roles in autophagy and in cell death induced by inhibition of glucose metabolism.<sup>32–34</sup> Noxa was originally described as a primary p53-response gene and mediator of p53-dependent apoptosis<sup>27</sup> but can also be transcriptionally induced during ischemia through hypoxia-inducible factor (HIF)-1 $\alpha$ ,<sup>35</sup> JNK and AMPK activation.<sup>27,36</sup> This study investigated whether *noxa* and *bmf* are induced in response to oxygen/glucose deprivation (OGD) in cultured cortical neurons *in vitro* and in a mouse model of transient focal ischemic injury *in vivo* and investigates the role of these pro-apoptotic genes in mediating neuronal injury *in vitro* and *in vivo*.

## Results

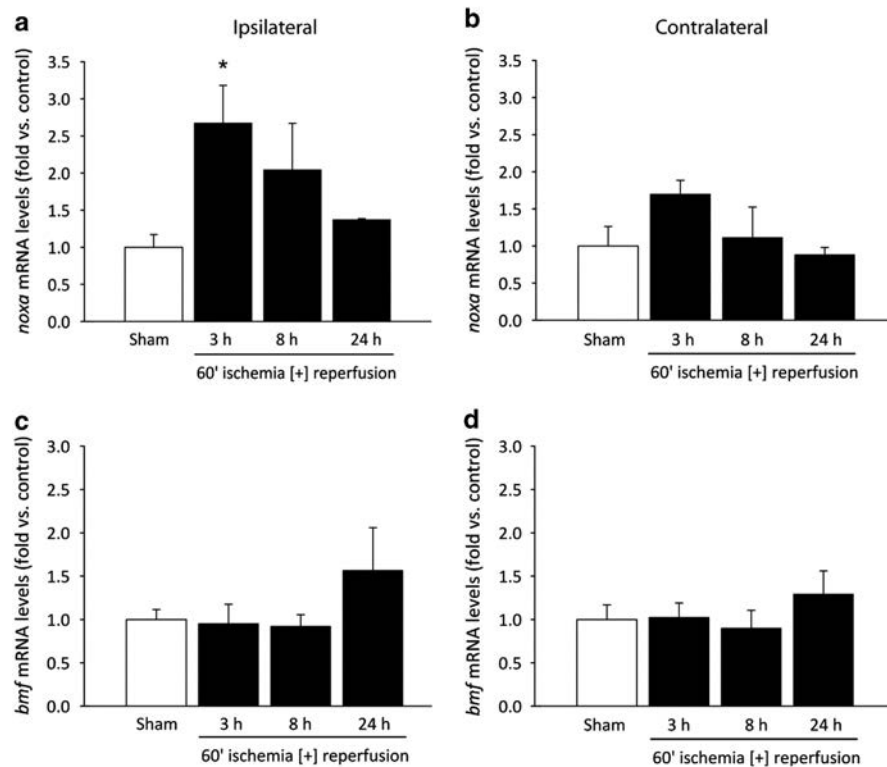
**Levels of *noxa* mRNA are increased following OGD in primary cortical neurons.** In order to identify which pro-apoptotic BH3-only proteins may have a role in ischemic neuronal injury, cultures of neocortical neurons were subjected to OGD *in vitro*. Mature cultures of neocortical neurons were subjected to 45 min of OGD and allowed to recover under normoxic conditions for various timepoints (4, 6, 24 h)

at which points mRNA levels of BH3-only proteins were assessed by real-time quantitative PCR (qPCR) analysis. mRNA levels for *noxa* were found to be upregulated from 4 h onward, and levels were maintained significantly up to 24 h at 3.9-fold (Figure 1a). Other markers investigated, including *bim* and *puma* (Figures 1b–d), showed no significant change when compared with controls. We also observed a delayed, 2.3-fold over-representation in *bmf* expression 24 h after OGD; however, this was not within the range of statistical significance.

***noxa* and *bmf* mRNA changes following transient focal cerebral ischemia.** Following the data obtained *in vitro* from neocortical neurons, we attempted to validate these results *in vivo* in a mouse model of transient focal ischemia. Wild-type (WT) mice were sham-treated or subjected to 60 min ischemia by occlusion of the middle cerebral artery (MCA) followed by reperfusion for 3, 8 and 24 h, at which time points mice were euthanized and brains were removed for gene expression analysis to determine the expression of *noxa* and *bmf* mRNA in the ipsilateral and contralateral cortex. Real-time qPCR analysis determined that *noxa* mRNA expression was significantly increased 2.7-fold in the ipsilateral cortex of animals 3 h following reperfusion and maintained a 2.1- and 1.4-fold increase at 8 and 24 h, respectively, returning towards baseline (Figure 2a), compared with ipsilateral cortices of sham-operated mice. Cortical expression of *bmf* mRNA was maintained at baseline, 3 and 8 h and increased 1.6-fold at 24 h following reperfusion after MCA occlusion in



**Figure 1** Induction of BH3-Only proteins in response to OGD in cortical neurons. Real-time qPCR analysis of mRNA expression of BH3-only proteins in cortical neurons subjected to 45 min OGD and allowed to recover under normoxic conditions for the times indicated. Controls were maintained under normoxic conditions. (a) mRNA levels for *noxa* were found to be upregulated from 4 h, and levels were maintained significantly up to 24 h. (b) *bmf* mRNA is not significantly induced by OGD. (c and d) Other markers investigated, *bim* and *puma*, respectively, showed no significant change when compared with control. Data were normalized to  $\beta$ -actin levels and expressed as relative to controls; presented as mean  $\pm$  S.E.M.;  $n = 3$  separate experiments carried out in triplicate. \* $P < 0.05$  compared with sham-treated control (ANOVA, *post hoc* Tukey's test)



**Figure 2** Induction of *bmf* and *noxa* following transient focal cerebral ischemia in wt mice. Real-time qPCR measurement of (a and b) *noxa* and (c and d) *bmf* mRNA expression in the cortex 3, 8 and 24 h following 60 min MCA occlusion with reperfusion. Data were normalized to  $\beta$ -actin levels and fold increases expressed relative to matched controls for  $n=3$  per group. \* $P<0.05$  compared with sham-treated control (ANOVA, *post hoc* Tukey's test)

the ipsilateral cortex (Figure 2c) compared with sham-operated ipsilateral cortices, but again this did not reach the level of statistical significance. Contralateral cortical mRNA expression of mice subjected to transient middle cerebral artery occlusion (tMCAO) showed no significant difference to sham-operated contralateral cortices but tended to mirror the trends observed in the ipsilateral cortex (Figures 2b and d), consistent with a progressive increase of intracranial pressure due to cerebral edema. These data confirm *in vitro* observations of early *noxa* induction after ischemic conditions, maintained up to 24 h. In contrast, induction of *bmf* mRNA, similar to the OGD experiments, was not statistically significant following cerebral ischemia (Figure 2c).

**Deletion of *noxa* does not confer protection to excitotoxic and OGD-induced neuronal injury in cultured primary cortical neurons.** Early and significant induction of *noxa* mRNA observed both *in vitro* after OGD and *in vivo* in response to ischemia prompted investigation of Noxa protein induction and the effects of deletion of *noxa* in ischemic neuronal injury. Levels of Noxa were examined in WT primary cortical neurons after OGD treatment followed by recovery for 0, 1, 4, 6 and 24 h by western blotting. Controls were sham-exposed and maintained under normoxic conditions. Forty-five minutes of OGD in healthy primary cortical neurons was sufficient to induce a significant increased expression of Noxa protein from 0 h after treatment and maintained significantly up to 24 h (Figure 3a) compared with normoxic controls, consistent with the observed upregulation of *noxa* mRNA. As

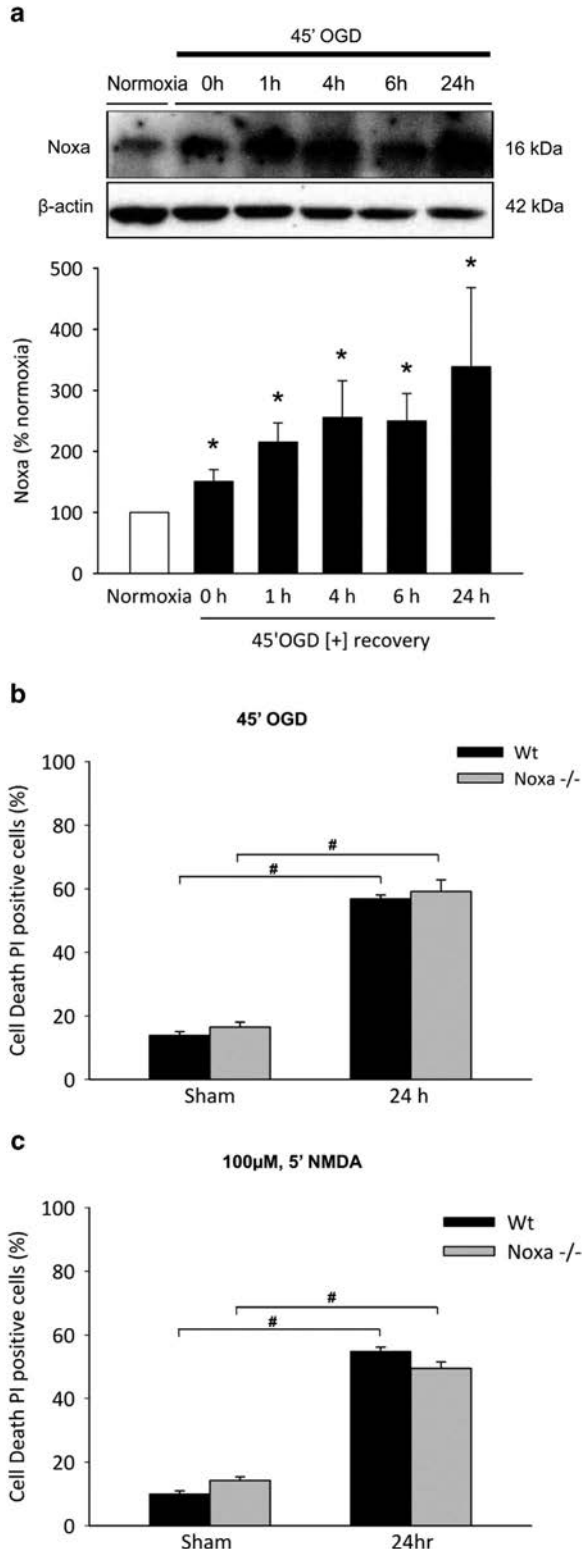
a positive control for OGD-induced neuronal injury, we observed a significant increase in the accumulation of caspase/calpain-mediated II-spectrin breakdown cleavage products<sup>37–39</sup> in cortical neurons after OGD (see below; Figure 5b).

In order to examine the effects of deletion of *noxa* in ischemic neuronal injury, cortical neurons derived from WT and *noxa*-deficient mice were sham-treated or subjected to either 45 min OGD or exposure to *N*-methyl-D-aspartate (NMDA)/glycine (100  $\mu$ M/10  $\mu$ M) for 5 min and allowed to recover under normoxic conditions for 24 h. Controls were sham-exposed and maintained under normoxic conditions. Assessment of cell death 24 h after OGD treatment (Figure 3b) or NMDA treatment (Figure 3c) by Hoechst and PI staining indicated no difference in the cell death levels in WT cortical neurons subjected to OGD ( $56.82\% \pm 1.22$ ) or NMDA ( $54.89\% \pm 1.31$ ) insult compared with *noxa*-deficient cortical neurons subjected to OGD ( $59.17\% \pm 3.62$ ) or NMDA ( $49.47\% \pm 2.03$ ), demonstrating that no significant protection is conferred with deletion of *noxa* *in vitro*.

***noxa*-deficient mice are not protected from ischemic injury *in vivo*.** Next we sought to determine a role for Noxa *in vivo* by ischemic infarct assessment in WT compared with *noxa*-deficient mice subjected to transient focal cerebral ischemia. We confirmed no significant difference in age and weight of the mice at the time of experiment and observed no significant differences between genotypes in the plasticity of the posterior communicating artery (PcomA; see Methods).



Assessment of infarct volume was made 24 h following 60 min MCA occlusion with reperfusion by Cresyl violet/Nissl staining encompassing the cortex and striatum within the vascular territory of the MCA and expressed as a percentage of contralateral hemisphere to correct for differences in

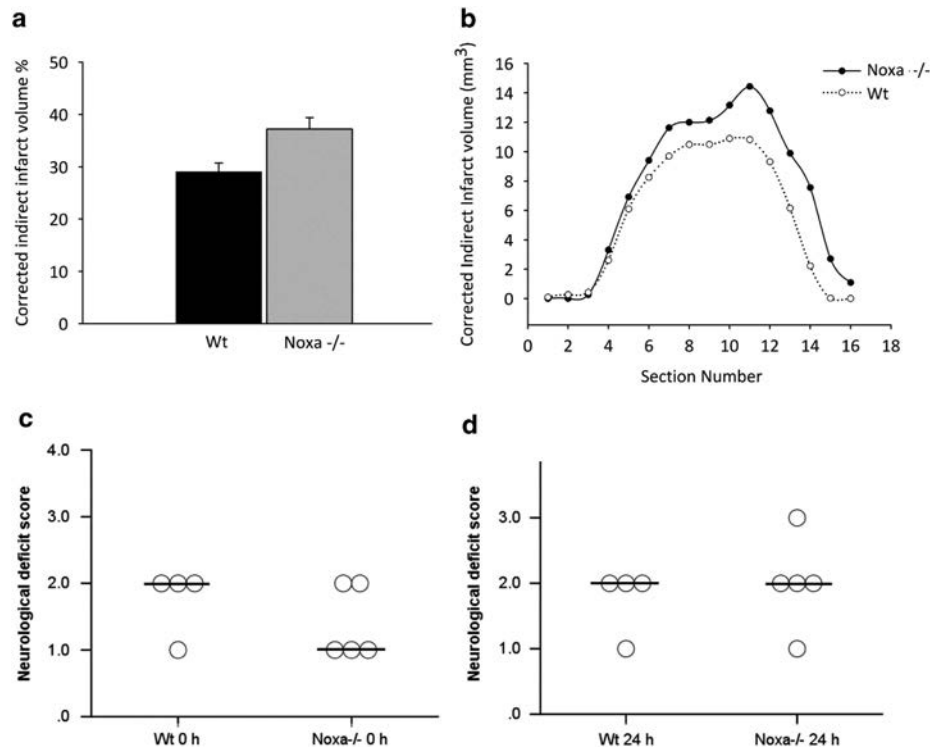


the brain size and brain edema. Mice deficient in *noxa* did not demonstrate any significant reduction in infarct volume (Figure 4a), with an infarct volume of  $37.2 \pm 2.2\%$  compared with  $29.0 \pm 1.7\%$  in WT animals (Figures 4a and b). Neurological deficit scores were also evaluated at 0 h (Figure 4c) and 24 h (Figure 4d) following ischemia with reperfusion. There was no significant improvement in neurological deficits observed in *noxa*-deficient mice at either time point examined. Taken together, the above data demonstrate that the early induction of *noxa* may contribute to non-excitotoxic components of neuronal injury but has no influence neuronal survival after OGD *in vitro* or ischemic injury *in vivo*.

**Bmf protein levels are increased following OGD in primary cortical neurons and focal cerebral ischemia in mice.** To explore a possible increase in Bmf protein expression following ischemic neuronal injury, levels of Bmf were examined in primary cortical neurons after OGD treatment and in the ipsilateral cortex of WT mice subjected to 60 min ischemia followed by reperfusion for 3 and 24 h by western blotting. Forty-five minutes of OGD in healthy primary cortical neurons was sufficient to induce a significant increased expression of Bmf 24 h after treatment (Figure 5a). Expression of Bmf was also found to be significantly increased in the ipsilateral cortex of WT mice at 24 h following reperfusion after ischemia (Figure 5c).

To confirm initiation of apoptotic cell death resulting from OGD or ischemia, quantitative western blotting analysis was also carried out for *all*-spectrin proteolysis. *all*-Spectrin proteolysis during apoptosis triggered by cerebral ischemia has been implicated in hypoxic-ischemic neuronal injury.<sup>37,40,41</sup> Considerable evidence documenting the accumulation of caspase-3- and calpain-mediated *all*-spectrin breakdown products and corresponding decrease of full-length *all*-spectrin protein after OGD in hippocampal slice cultures *in vitro* and in the ipsilateral cortex of rodents subjected to tMCAO injury *in vivo* provides substantial evidence supporting the use of *all*-spectrin breakdown as a

**Figure 3** Induction of Noxa and effect of *noxa* deletion on neuronal injury primary cortical neurons. (a) Western blotting and densitometric analysis comparing the levels of Noxa induction in OGD-treated cortical neurons allowed to recover under normoxic conditions for the times indicated, confirming significant Noxa protein induction. Significant increases in Noxa induction were observed at 0 h and maintained up to 24 h compared with normoxic controls. Data presented as mean  $\pm$  S.E.M. from  $n=4$  independent experiments from  $n=4$  independent cultures. \* $P<0.05$  compared with sham-treated controls. (b and c) Cortical neurons derived from WT and *noxa*-deficient mice were sham-treated or subjected to either 45 min OGD or a model of excitotoxic NMDA receptor overactivation by exposure to NMDA/glycine (100  $\mu$ M/10  $\mu$ M) for 5 min and allowed to recover under normoxic conditions for 24 h. Cell death was assessed after 24 h in each model by Hoechst and PI staining, and three subfields were captured per well, with a minimum of three wells analyzed per condition. Nuclei uniformly stained with Hoechst were counted as viable and condensed; PI-positive nuclei were scored as dead neurons and expressed as a percentage of the total population. Deficiency of *noxa* in cortical neurons neither reduced (b) OGD- or (c) glutamate-induced neuronal injury in cortical neurons. Data presented as mean  $\pm$  S.E.M., figures representative of  $n=3$  independent experiments from  $n=3$  independent cultures carried out in triplicate with similar results. \* $P<0.05$  compared with sham-treated control; # $P<0.05$  between treatments (ANOVA, *post hoc* Tukey's test)



**Figure 4** *noxa*-Deficiency confers no protection against ischemic injury. Infarct volume was assessed 24 h after focal cerebral ischemia by cresyl violet/Nissl staining. Infarct volume was calculated for direct infarct volume and corrected for edema of infarcted tissue for (a) total indirect infarct volume and (b) indirect infarct volume of each section. Mice deficient in *noxa* failed to influence infarct size compared with WT (Mann–Whitney *U* test). Results were quantified and presented as a percentage of infarct volume compared with WT treated. (c and d) Neurological deficit scores after induction of tMCAO in WT and *noxa*-deficient mice at 0 and 24 h following 60 min ischemia with reperfusion. No differences in neurological scoring outcome were found between *noxa*-deficient compared with WT matched controls after 24 h reperfusion. Circles and bar represent deficit score and median score, respectively. Data are representative of  $n \geq 4$ –5 for each group WT and *noxa*-deficient mice

useful biomarker in models of focal ischemia.<sup>37–39</sup> Western blotting analysis revealed a significantly increased accumulation of the 145 kDa  $\alpha$ -spectrin breakdown product both *in vitro* in cortical neurons (Figure 5b) and *in vivo* in the ischemic ipsilateral cortex (Figure 5d) at 24 h, indicating the initiation of calpain/caspase-3-dependent apoptosis as a result of OGD and focal cerebral ischemia.

**Cell death is attenuated in *bmf*-deficient primary cortical neuron cultures following OGD.** We also examined the effect of gene deficiency of *bmf* in *in vitro* models of neuronal injury, by OGD and excitotoxic NMDA receptor overactivation in cortical neurons derived from WT and *bmf*-deficient mice. Assessment of cell death 24 h after OGD treatment (Figure 6a) or NMDA treatment (Figure 6b) by Hoechst and PI staining indicated significantly reduced cell death in *bmf*-deficient neurons subjected to OGD ( $31.4 \pm 1.6\%$ ) or NMDA ( $42.2 \pm 2.0\%$ ) insult compared with WT cortical neurons subjected to OGD ( $45.2 \pm 1.0\%$ ) or NMDA ( $56.3 \pm 1.15\%$ ), implicating *bmf* in the apoptotic response to both OGD and NMDA receptor overactivation. In both experiments, there was no difference in cell death between WT and *bmf*-deficient cells for sham-treated controls.

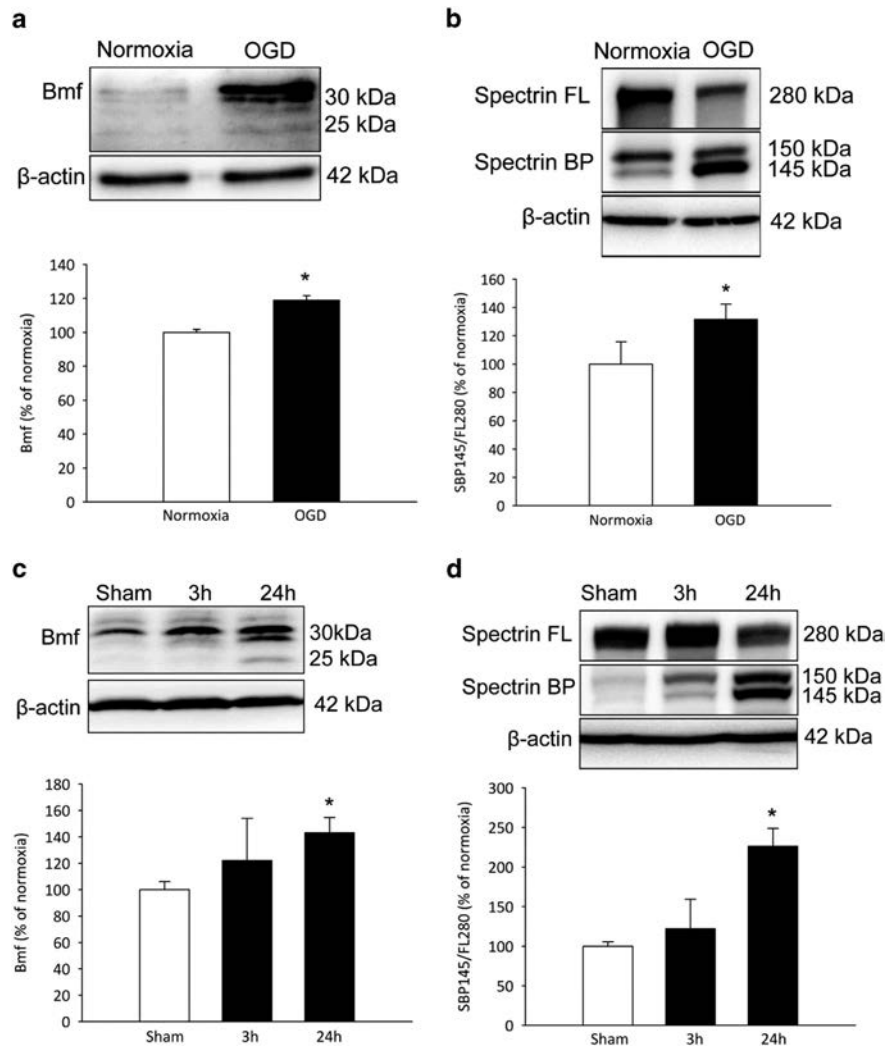
In order to demonstrate that overexpression of *bmf* would reverse the neuroprotective effect observed in *bmf*-deficient neurons, cortical neurons derived from WT mice were co-transfected with a vector expressing *bmf* and an enhanced

green fluorescent protein (eGFP)-expressing vector and subjected to OGD. Assessment of cell death of eGFP-positive cells 24 h after OGD treatment (Figure 6c) indicated that overexpression of *bmf* significantly exacerbated cell death when compared with control eGFP-transfected neurons.

#### ***bmf* may contribute to ischemic neuronal injury *in vivo*.**

We then sought to examine the effect of *bmf* deletion *in vivo*, comparing infarct volume in WT mice to *bmf*-deficient mice after tMCAO. Again, no significant difference in age and weight of the mice at the time of experiment was confirmed, and plasticity of the PcomA was observed (see Methods). Assessment of infarct volume revealed mice deficient in *bmf* demonstrated no significant difference in infarct volume following tMCAO (Figures 7a and b) when compared with WT. The infarct volume in *bmf*-deficient mice was  $27.9 \pm 1.8\%$  compared with  $35.9 \pm 5.2\%$  in WT mice; however, this did not reach the level of statistical significance.

Decreased neurological deficit scoring was also observed at 0 h (Figure 7c) and 24 h (Figure 7d) following ischemia with reperfusion, with *bmf*-deficient mice (Median (interquartile range), 1.5 (1.0)) showing improved deficits compared with WT mice (Median (interquartile range), 1.75 (0.5)) at 24 h (Figure 7d;  $P < 0.05$ ). Two WT mice showed stroke-related mortality before 24 h. Inclusion of these mice resulted in a neurological deficit score of 1.5 (1.0) (Median (interquartile range)) in *bmf*-deficient mice compared with 2.0 (1.63)



**Figure 5** Increased Bmf protein expression following OGD in cortical neurons and transient focal cerebral ischemia in WT mice. (a and b) Western blotting and densitometric analysis comparing the levels of Bmf induction and Spectrin cleavage in cortical neurons, (a) confirming Bmf protein induction at 24 h and (b) demonstrating an increased accumulation of calpain/caspase-3-generated  $\alpha$ II spectrin breakdown products (145/150 kDa) in OGD-treated cultures. Significant increases in Bmf protein induction and Spectrin cleavage were observed at 24 h compared with sham-treated cultures. Data presented as mean  $\pm$  S.E.M. from  $n=5$  independent experiments from  $n=5$  independent cultures carried out in triplicate. \* $P<0.05$  compared with sham-treated controls. (c and d) Western blotting and densitometric analysis comparing levels of Bmf induction and Spectrin cleavage in the ipsilateral cortex 3 and 24 h following ischemia in WT mice, (c) confirming Bmf protein induction and (d) demonstrating an increased accumulation of  $\alpha$ II spectrin breakdown products at 24 h reperfusion. Significant increases in Bmf protein induction and Spectrin cleavage were observed at 24 h compared with matched controls. Densitometry data are expressed as Bmf or as a ratio of the 145 kDa spectrin breakdown product (BP) and the 280 kDa full length (FL) protein normalized to  $\beta$ -actin. Data presented as mean  $\pm$  S.E.M. from  $n=4$  per group. \* $P<0.05$  compared with matched controls

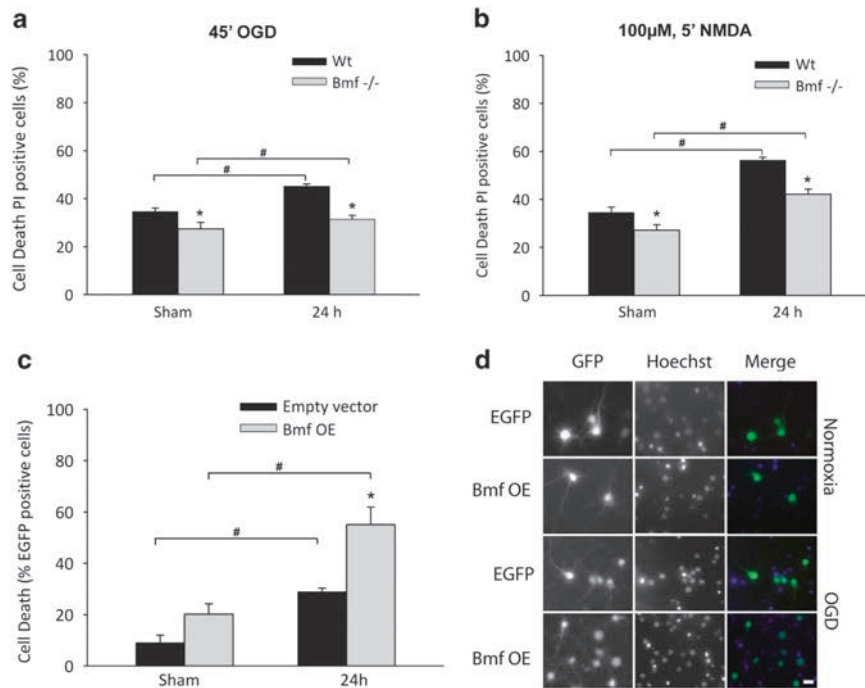
(Median (interquartile range)) in WT mice, which again was statistically significant (Figure 7e). Collectively, this data indicate that deletion of *bmf* confers protection against OGD in primary cultured cortical neurons and suggests that *bmf* may contribute to ischemic neuronal injury and neurological deficit outcome *in vivo*.

## Discussion

Hypoxic-ischemic brain injury and associated cellular events are worthy of particular investigation as a well-known cause of neuronal cell death and damage. Pathophysiological analysis after focal brain ischemia reveals a necrotic core area of irreversible cell death resulting from total bioenergetic failure due to dramatically reduced metabolic rates of oxygen and

glucose. Surrounding this necrotic core lies the ischemic penumbra, an area of less severe damage, functionally impaired but metabolically active tissue, balanced precariously between a complex schism of endogenous neuroprotective and neurotoxic events.<sup>1</sup> Elucidation of the triggers and mediators of ischemic cell death mechanisms may provide gene-targeted intervention for neuroprotection in stroke, preventing ongoing injury and infarct progression.

To this end, our data from the present study indicate that the pro-apoptotic gene, *nox*, although significantly induced, may possibly not become a relevant therapeutic target for the treatment of ischemic stroke. Using gene expression analysis, we observed a robust early induction of *nox* mRNA and a corresponding significant induction of Noxa protein levels during OGD in cortical neurons. The transcriptional



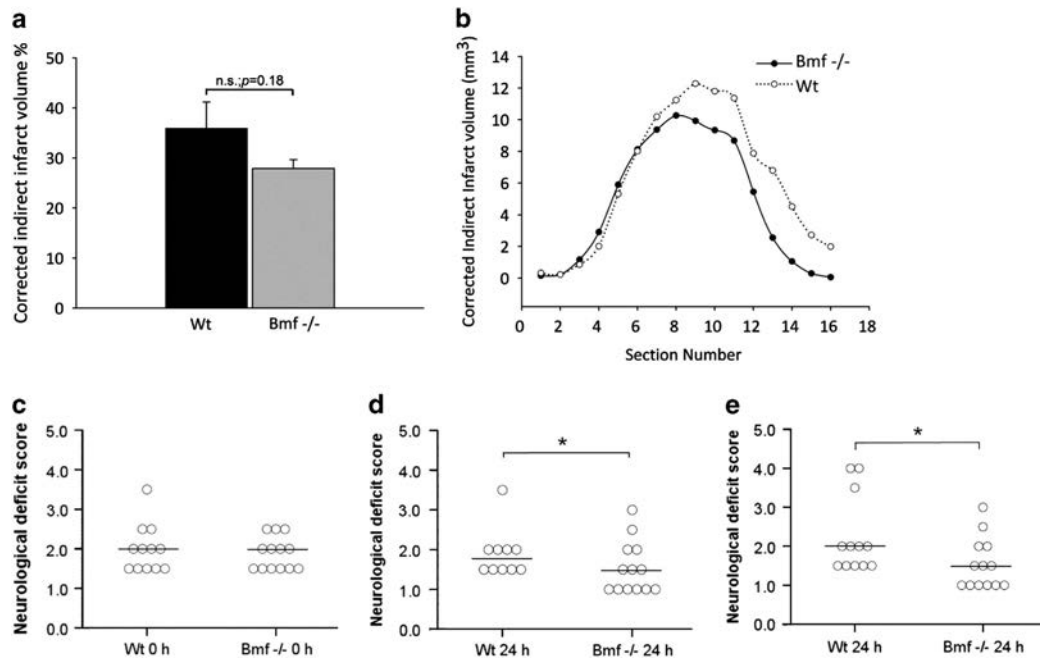
**Figure 6** Deletion of *bmf* confers protection against neuronal injury induced by OGD in cultured primary cortical neurons. Cortical neurons derived from WT and *bmf*-deficient mice were sham-treated or subjected to either 45 min OGD or a model of excitotoxic NMDA receptor overactivation by exposure to NMDA/glycine (100  $\mu$ M/10  $\mu$ M) for 5 min and allowed to recover under normoxic conditions for 24 h. Cell death was assessed 24 h after OGD or NMDA treatment in each model by Hoechst and PI staining. **(a and b)** Cell death was significantly reduced in *bmf*-deficient neurons compared with WT, strongly implicating *bmf* in the apoptotic response to both **(a)** OGD and **(b)** excitotoxic NMDA receptor overactivation. Data presented as mean  $\pm$  S.E.M., figures representative of  $n = 3$  independent experiments from  $n = 3$  independent cultures carried out in triplicate with similar results. \* $P < 0.05$  compared with sham-treated control; # $P < 0.05$  between treatments (ANOVA, *post hoc* Tukey's test). **(c)** Quantification of the effect of Bmf overexpression (OE) in cortical neurons on cell survival after OGD. Neurons were sham-treated or subjected to 45 min OGD and allowed to recover under normoxic conditions for 24 h. GFP and Hoechst 33358 (1  $\mu$ g/ml) fluorescence images were acquired to identify transfected cells and quantify nuclear apoptosis. The number of Hoechst-positive cells with condensed nucleus in eGFP-positive transfected neurons was quantified. Data presented as mean  $\pm$  S.E.M. from  $n = 2$  independent platings carried out in triplicate and pooled. \* $P < 0.05$  compared with sham-treated control; # $P < 0.05$  between treatments. **(d)** Representative images of Bmf and eGFP co-transfected neurons and control eGFP transfected neurons sham-treated or subjected to 45 min OGD and allowed to recover under normoxic conditions for 24 h. Scale bar, 10  $\mu$ m

upregulation of *nox*a observed by conditions of OGD *in vitro* and focal ischemia *in vivo* is consistent with results reporting induction of *nox*a during hypoxia and after transient ischemia *in vivo* by Hif1 $\alpha$  as a mediator of hypoxic cell. <sup>25,35</sup> Hence the dependence of Noxa induction is not restricted to p53 and associated regulators,<sup>27,36</sup> *nox*a transcription and expression can be activated by diverse apoptotic signals in both a p53-dependent and independent manner, with numerous regulators and control mechanisms that may be activated to induce *nox*a at the transcript level,<sup>36</sup> leading to strong upregulation of *nox*a mRNA via multiple pathways as observed in our study. Surprisingly, however, our experiments revealed that gene deficiency in *nox*a did not protect against OGD-induced injury *in vitro* and that *nox*a-deficient mice were as susceptible to ischemic damage as WT littermates. Interestingly, Kim *et al.* <sup>35</sup> demonstrated a reduction of infarct volume in a rat model of focal ischemia by suppression of *nox*a expression by antisense oligonucleotides. Disparity in infarct volumes across models may be a result of experimental design and variation<sup>42</sup> or could be due to species differences. It should also be noted that, despite successful applications of antisense strategies in gene silencing, the use of antisense oligonucleotides as an alternative to gene-knockout models *in vivo* in practice should be performed with adequate controls to ascertain whether observed physiological effects are the result of an antisense

mechanism and not from non-specific effects, such as an intrinsic activity of the phosphorothioate backbone.<sup>43</sup>

Noxa is known to be poorly apoptotic in some cell types,<sup>21,36</sup> and compared with other BH3-only proteins, Noxa demonstrates tethered potential for neutralization of pro-survival Bcl-2 proteins, with a more restricted role binding only Mcl-1 and A1.<sup>20,21</sup> In this context, it is interesting to note that targeting of Mcl-1 by transgenic overexpression of Noxa failed to induce significant cell death in adenovirus oncoprotein E1A immortalized MEFs or NIH3T3 fibroblasts.<sup>26</sup> Indeed, in a comparison of DNA-damage-induced apoptosis in mice lacking *puma* and/or *nox*a, damage was observed to be cell-type dependent; in mature CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells and macrophages, Puma alone was sufficient to induce apoptosis, while loss of Noxa alone did not notably protect B or T cells.<sup>44</sup> Puma was demonstrated to have a major role in most cell types studied, whereas Noxa was only seen to contribute in certain cell types. Contribution of Noxa to cell death may require cell-type dependent engagement of other additional pro-apoptotic factors. Although our analysis has attempted to exclude potentially mitigating factors, cerebrovascular development, subtle anatomical or physiological differences could contribute to our results. However, our data imply that the net effect of *nox*a is unlikely to contribute significantly to neuronal death signaling after cerebral ischemia.





**Figure 7** *bmf*-Deficiency confers protection against ischemic injury. Infarct volume was assessed 24 h after focal cerebral ischemia by cresyl violet/Nissl staining. Infarct volume was calculated for direct infarct volume and corrected for edema of infarcted tissue for (a) total indirect infarct volume and (b) indirect infarct volume of each section. Lower representation of infarct volume in mice deficient in *bmf* following tMCAO was not found to be significantly reduced when compared with WT mice (Mann–Whitney *U* test). Results were quantified and presented as a percentage of infarct volume compared with WT-treated mice. (c and d) Neurological deficit scores after induction of tMCAO in WT and *bmf*-deficient mice at 0 and 24 h following 60 min ischemia with reperfusion. Mice deficient in *bmf* score were significantly better than WT matched controls after 24 h reperfusion (Fisher's exact test). (e) Neurological deficit scores at 24 h following 60 min ischemia with reperfusion with inclusion of two WT mice that demonstrated stroke-related mortality before 24 h. The *bmf*-deficient mice maintained a significant reduced deficit compared with WT controls after 24 h reperfusion. Circles and bar represent deficit score and median score, respectively; \**P* < 0.05 compared with WT control. Data are representative of *n* ≥ 12–13 for each group of WT and *bmf*-deficient mice

In contrast to *nox*, we did not observe a significant induction of *bmf* mRNA after OGD or cerebral ischemia. Subsequent experiments revealed a significant induction of Bmf protein levels following OGD in cortical neurons and after ischemic injury *in vivo*. Of note, experiments performed in primary cortical neurons indicated a significant protection in *bmf*-deficient neurons both *in vitro* after OGD- and NMDA-induced excitotoxic injury. In contrast, overexpression of Bmf resulted in significantly exacerbated cell death. *bmf* deficiency also demonstrated significantly reduced neurological scores after ischemic stroke in an *in vivo* model of tMCAO in mice. Clearly, it is possible that other BH3-only proteins such as Bid, Bim and Puma may compensate for a *bmf*-deficiency *in vivo*.<sup>22,23,44,45</sup> Of note, *bmf* mRNA did not appear to be transcriptionally induced early in response to injury. This suggested that *bmf* contributes to neuronal injury via posttranscriptional activation mechanisms. Bmf is sequestered to the actin cytoskeleton-based myosin V motor complex through its interaction with dynein light chain (DLC)-2 and is released in response to stress stimuli to stimulate apoptosis.<sup>28</sup> The DLC-binding motif in Bmf closely resembles the region in Bim that mediates its binding to DLC-1,<sup>46,47</sup> and this interaction with DLC-2 negatively regulates the pro-apoptotic activity of Bmf,<sup>28</sup> the localization of Bim and Bmf to the microtubules and actin cytoskeleton, respectively, may be determined fundamentally by their respective DLC partners. Additionally, Bmf has been shown to be induced posttranscriptionally through enhanced translation under conditions

that cause repression of the CAP-dependent translation machinery, including hypoxia.<sup>30</sup>

Several BH3-only proteins, such as Bid, Bim and Bad,<sup>22,48,49</sup> are also constitutively expressed in the brain and rapidly activated in response to focal cerebral ischemia. Collectively, these results suggest that *bmf* activation may contribute to the development of ischemic neuronal injury; however, there is likely a functional redundancy observable in BH3-only proteins contributing to ischemic neuronal injury, with similar lack of protection/tendency towards protection observed with deletion of *puma* in focal cerebral ischemia.<sup>24</sup> Investigation of ischemic damage in BH3-only protein double-knockout models may be valuable to determine whether conductive actions of Noxa or Bmf with other BH3-only proteins occur, as reported in other cell death models.<sup>50</sup>

Collectively, the present study not only provides evidence for a role of Bmf as a BH3-only protein contributing to hypoxic/ischemic neuronal injury but also demonstrated that the early induction of *nox* did not influence neuronal survival or ischemic injury, suggesting functional redundancy among BH3-only proteins for ischemia-induced neuronal death or functions of *nox* independent of cell death signaling. These findings are important for future target selection strategies such as neuroprotective interventions to combat ischemic brain injury.

#### Materials and Methods

**Gene-targeted mice.** Animal experiments were carried out under license from the Department of Health and Children (Ireland) and in accordance with European Communities Council Directive (86/609/EEC). All procedures were reviewed and

approved by local Research Ethics Committee of the Royal College of Surgeons in Ireland. For the analysis of *bmf* and *noxa* expression, targeted *bmf* and *noxa* mutant mice originally generated from C57BL/6-derived Bruce4 ES cells backcrossed onto a C57BL/6J background were provided by Professor Andreas Strasser (WEHI, Melbourne, Australia) and bred as homozygous knockout colonies.<sup>32,51</sup> WT C57BL/6J mice were obtained from the Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME, USA) and were backcrossed with *bmf* and *noxa* WT littermates for >10 generations for comparison to *bmf* and *noxa*-deficient mice

**Genotype analysis.** WT and knockout alleles for *bmf* and *noxa* were confirmed by PCR analysis of genomic DNA extracted from tail snips using High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche, Basel, Switzerland). Genotyping was performed using the specific primers: 5'-GGAGTTCAGACTTCGCCGAGAG-3', 5'-GGCTGGTCAAAAGTTTGACACTG-3' (WT allele-specific); 5'-GGAGTTCAGACTTCGCCGAGAG-3', and 5'-GCAAGAGGCAAGCCCTTCACTTGG-3' (mutant allele-specific) for *bmf*; and 5'-GGAGGGCATAATGGGCAATGACAC-3' (common), 5'-GATGCTTCTGGGTGCACCCACAC-3' (WT allele-specific reverse), and 5'-AAAGCAATCCCAACGAC-3' (mutant allele-specific reverse) for *noxa*.

**Preparation of primary mouse neocortical neurons and cell culture.** Primary cultures of murine neocortical neurons were prepared and cultured as described previously<sup>52</sup> with modifications. Briefly, hysterectomies of embryonic day 16–18 pregnant female WT, *bmf*- and *noxa*-deficient mice were carried out following cervical dislocation and embryonic cerebral cortices transferred to dissection medium on ice (PBS with 0.25% glucose and 0.3% BSA). The tissue was incubated in 0.25% trypsin-EDTA for 15 min at 37 °C, and trypsinization was stopped using media containing sera. Neurons were dissociated by gently pipetting and centrifuged at 300 × g for 3 min, and the media containing trypsin was aspirated. Neocortical neurons were triturated in fresh plating medium (MEM containing 5% fetal bovine serum, 5% horse serum, 100 U/ml penicillin/streptomycin, 0.5 mM L-glutamine and 0.6% D-glucose). Cells were plated on poly-D-lysine-coated plates at 2 × 10<sup>5</sup> cells/cm<sup>2</sup> and maintained at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> humidified atmosphere. After 24 h, medium was exchanged for 1:1 plating medium and feeding medium (Neurobasal media containing 100 U/ml penicillin/streptomycin, 2% B27 and 0.5 mM L-glutamine) containing 600 nM cytosine arabinofuranoside. At DIV (days *in vitro*) 3, medium containing cytosine arabinofuranoside was exchanged for fresh feeding media. All *in vitro* experiments were performed on mature cultures at DIV 8–12.

**Plasmids and transfection.** Primary cortical neurons (DIV 10) were transfected using calcium phosphate.<sup>53</sup> For overexpression of *bmf*, cells were transfected with a plasmid encoding murine *bmf* (generously provided by Professor A Villunger, Innsbruck Medical University, Innsbruck, Austria).<sup>30</sup> A plasmid with enhanced GFP (eGFP-N1; Clontech, Saint-Germain-en-Laye, France) was used to allow the identification of transfected neurons for cell death assays. Cells were used for experiments 48 h after transfection.

**Oxygen–glucose deprivation.** Healthy primary cortical neuron cultures at DIV 8–9 transferred to a hypoxic chamber (COY Lab Products, Grass Lake, MI, USA) with an atmosphere comprising 1.5% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> and 85% N<sub>2</sub>, with temperature maintained at 35 °C. Feeding medium was removed from cultures and replaced with preequilibrated, deoxygenated OGD medium bubbled with N<sub>2</sub> for 1 h, consisting of (in mM): 0.3 CaCl<sub>2</sub>, 70 NaCl, 5.25 NaHCO<sub>3</sub>, 70 KCl, 1.25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 MgSO<sub>4</sub>, 10 sucrose, pH 6.8. After 45 min of OGD, cultures were returned to oxygenated feeding medium and allowed to recover for 24 h under normoxic conditions (21% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>). Sham-treated cultures were transferred to oxygenated glucose-free medium consisting of (in mM): 2 CaCl<sub>2</sub>, 125 NaCl, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 2.5 KCl, 1.25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 MgSO<sub>4</sub>, and 10 sucrose, pH 7.5 and maintained under normoxic conditions (21% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>).<sup>54</sup> Control cultures for protein and gene expression analysis were maintained under normoxic conditions.

**NMDA toxicity and determination of neuronal injury.** Cortical neurons cultured on 24-well plate for DIV 8–9 were sham-treated or subjected to a model of excitotoxic injury induced by NMDA receptor overactivation<sup>37</sup> by exposure to NMDA/glycine (100 μM/10 μM) for 5 min and washed twice in experimental buffer containing (in mM): 120 NaCl, 3.5 KCl, 0.4 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 20 HEPES, 5 NaHCO<sub>3</sub>, 1.2 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1.2 CaCl<sub>2</sub>, and 15 glucose, pH 7.4, supplemented with high Mg<sup>2+</sup> (1.2 mM).

Neuronal injury resulting from OGD, NMDA excitation or *Bmf* overexpression was assessed after 24 h in each model by staining neocortical neurons live with Hoechst 33258 at a final concentration of 1 μg/ml and propidium iodide (PI) (Sigma, St. Louis, MO, USA) dissolved in culture medium after 24 h for 10 min at 37 °C. After incubation, nuclear morphology was assessed using an Eclipse TE 300 inverted microscope (Nikon Instruments, Amsterdam, Netherlands) and ×20 NA 0.45 dry objective. Images were taken using a SPOT RT SE CCD camera (SPOT Imaging Solutions, Sterling Heights, MI, USA) and the appropriate filter sets. For each time point and treatment, nuclei uniformly stained with Hoechst were counted as viable and condensed, and PI-positive nuclei were scored as dead neurons and expressed as a percentage of the total population, three subfields captured per well, with a minimum of three wells analyzed per condition. Images were processed using NIH Image J (Wayne Rasband, National Institute of Health, Bethesda, MD, USA). All scoring was carried out in a blinded manner.

**Gene expression analysis using real-time RT-PCR analysis.** Total RNA was extracted from primary cortical neurons after OGD treatment *in vitro* or from murine cerebral cortex 3, 8 and 24 h after 60 min transient MCA occlusion using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). First-strand cDNA synthesis was performed using 1 μg of total RNA as template and reverse transcribed using Superscript II (Invitrogen, Waltham, MA, USA) primed with 50 pmol random hexamers. Quantitative real-time PCR was performed using the Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System in a MicroAmp optical 96-well reaction plate with optical covers (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) and the QuantiTect SYBR green PCR kit (Qiagen) according to the manufacturer's instruction. Sense and antisense primers used were as follows: 5'-CAACACAAACCAAGTCCT-3' and 5'-CATTGTGCAAAACACCCCTCCTT-3' for *bim*; 5'-CCCATAAGCCAGGAAGACAA-3' and 5'-CTGAAGCTTCTGGCGATCT-3' for *bmf*; 5'-TCAGGAAGATCGGAGACAAA-3' and 5'-TGAGCACACTCGCTCCTTCAA-3' for *noxa*; 5'-ATGGACTCAGCATCGGAAGG-3' and 5'-TGGCTCATTGCTCTTACG-3' for *puma*; and 5'-GGTGTGATGGTGGGAATGG-3' and 5'-GGTTGGCCTTAGGGTTTCAGG-3' for  $\beta$ -actin. The data were analyzed using the Analysis AB 7500 SDS Software (Applied Biosystems), and the generation of specific PCR product was confirmed by melting curve analysis. Data were presented as mean ± S.E.M.; all samples were normalized to  $\beta$ -actin levels and expressed as *n*-fold expression relative to matched controls for *n* = 3 separate experiments carried out in triplicate.

**Protein extraction and western blotting.** Tissue and cell pellets were lysed in ice-cold radio immunoprecipitation assay buffer (25 mM Tris HCl, 150 mM NaCl, 1% NP40, 1% sodium deoxycholate and 0.1% sodium dodecyl sulfate) followed by sonication of tissue on ice. Lysates were centrifuged at 10 000 × g for 10 min at 4 °C, and supernatants were used for western blotting. Resulting membranes were probed with a mouse monoclonal  $\alpha$ -fodrin ( $\alpha$ II-Spectrin) antibody (clone AA6; Millipore, Billerica, MA, USA, 1:1000), rat anti-*Bmf* monoclonal antibody (a gift from A Villunger, Innsbruck Medical University, Innsbruck, Austria; 1:500), rabbit anti-*Noxa* polyclonal antibody (ab23563; Abcam, Cambridge, UK, 1:2000) or a mouse monoclonal anti- $\beta$ -actin (Sigma, 1:5000). Species-specific horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (Pierce, Rockford, IL, USA, 1:5000) were detected using the Super-Signal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce) and imaged using a FujiFilm LAS-3000 imaging system (FujiFilm, Sheffield, UK).

**Evaluation of PcomA plasticity.** Evaluation of the PcomA plasticity was carried out in male WT, *bmf*- and *noxa*-deficient mice aged 8–10 weeks (20–24 g) as described<sup>55</sup> without ischemia. Briefly, animals were anesthetized with Pentobarbital Sodium (Dolethal; 200 mg/kg), and transcardial perfusion fixation was performed with 20 ml 10 U/ml heparin in Ringer's solution and 20 ml 4% PFA followed by Cresyl Violet (5%, 1 ml). The plasticity of the bilateral PcomA was evaluated independently by a blinded investigator (GC) using a dissecting microscope and graded on a qualitative scale of 0–3 as follows: Score 0, no anastomosis between posterior cerebral artery (PCA) and superior cerebellar artery (SCA); Score 1, anastomosis between PCA and SCA in capillary phase; Score 2, small truncal PcomA; and Score 3, truncal PcomA. Statistical significant differences were analyzed using non-parametric statistics; no significant difference in PcomA plasticity was observed in *bmf*- or *noxa*-deficient versus WT control mice, *n* > 6 per genotype (Fisher's exact test). The median score of PcomAs were (Median (interquartile range)) 1.0 (0.75) for *noxa*-deficient mice, 2.0 (0) for *bmf*-deficient mice and 1.0 (1.75) for WT mice.

**Focal cerebral ischemia model.** Induction of transient focal cerebral ischemia was performed in male WT, *bmf*- and *noxa*-deficient mice aged 8–10 weeks (20–24 g) using the monofilament suture method as described<sup>56,57</sup> with modifications. Briefly, mice were anesthetized with 5% isoflurane 30% O<sub>2</sub> and 65% N<sub>2</sub>O and maintained with 2% isoflurane, 33% O<sub>2</sub> and 65% N<sub>2</sub>O for the duration of surgery (<20 min). Body temperature was maintained normothermic at 36.8–37.4 °C via a feedback-controlled heat blanket. A silicon-coated 8-0 nylon monofilament with rounded tip was introduced into the left internal carotid artery and advanced past the carotid artery bifurcation to occlude the MCA. After 60 min, the suture was removed to allow reperfusion. To control for effects of occlusion, sham-treated mice underwent the same surgical procedure, but the filament was not advanced to occlude the vessel. Effective occlusion and assessment of microcirculatory function was monitored by laser-Doppler flowmetry with a probe fixed to the exposed left parietal skull for continuous monitoring of regional cerebral blood flow (Perimed 5001 Master, Perimed, Järfälla, Sweden). Mice were euthanized 3, 8 and 24 h after reperfusion, and the brains were processed either for *bmf* and *noxa* expression analysis or for calculation of infarct volume. All surgical procedures were carried out in a blinded manner.

**Determination of ischemic infarct volume.** Infarct volume was assessed 24 h after ischemia by a blinded investigator; 10 µm coronal sections (*n* = 16) from each brain were cut by Leica CM1950 Cryostat (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Heidelberg Str, Germany) and taken at 500 µm intervals. Sections were stained with Cresyl violet/Nissl, and infarct area was evaluated quantitatively using an image analysis system by a blinded investigator (Leica Application Suite V3, Germany). Lesion volume was calculated as previously described<sup>57</sup> by the infarct area multiplied by the section thickness and summed over the entire brain for direct infarct volume and corrected for edema of infarcted tissue for indirect infarct volume. Data are expressed as the percentage of contralateral hemisphere to correct for differences in the brain size and brain edema.

**Neurological deficit.** Neurological deficit scores were assessed as described previously.<sup>22</sup> Briefly, the neurological function of mice was evaluated for severity by a blinded investigator (GC) at 0 or 24 h after ischemia using a five-point scale, as follows: Score 0, no deficit; Score 1, weakness of the contralateral forepaw; Score 2, circling; Score 3, loss of righting reflex; and Score 4, no motor activity. In a separate analysis, stroke-induced death of the animal was scored as 5.

**Statistical analysis.** Statistics were carried out on an SPSS-IBM software (IBM, Armonk, NY, USA). mRNA and densitometry data are presented as mean ± S.E.M. and were analyzed by using one-way ANOVA followed by Tukey's *post hoc* test to determine statistical significance. *P*-values < 0.05 were considered to be statistically significant. Infarct volumes were analyzed using non-parametric analyses (Kruskal–Wallis non-parametric analysis, Mann–Whitney *U*-test); Fisher's exact test was used to compare significant differences in PcomA plasticity and neurological deficit scores. Significance was accepted at *P* < 0.05.

## Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

**Acknowledgements.** The authors acknowledge the funding supported by Fundació Científica La Marató TV3 (111630/31) and SFI (08/IN.1/B1949). We wish to thank Professor Andreas Villunger for the generous gifts of the *Bmf* monoclonal antibody and plasmid; Professor Andreas Strasser and Professor Andreas Villunger for the *bmf*- and *noxa*-deficient mice; and Professor Eric Eldering for his help in the shipment of these mice.

1. Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* 1999; **22**: 391–397.
2. Liou AKF, Clark RS, Henshall DC, Yin XM, Chen J. To die or not to die for neurons in ischemia, traumatic brain injury and epilepsy: a review on the stress-activated signaling pathways and apoptotic pathways. *Prog Neurobiol* 2003; **69**: 103–142.
3. Li J, McCullough LD. Effects of AMP-activated protein kinase in cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2010; **30**: 480–492.
4. Ronnett GV, Ramamurthy S, Kleman AM, Landree LE, Aja S. AMPK in the brain: its roles in energy balance and neuroprotection. *J Neurochem* 2009; **109**(Suppl 1): 17–23.

5. Niizuma K, Yoshioka H, Chen H, Kim GS, Jung JE, Katsu M et al. Mitochondrial and apoptotic neuronal death signaling pathways in cerebral ischemia. *Biochim Biophys Acta* 2010; **1802**: 92–99.
6. Ferrer I, Planas AM. Signaling of cell death and cell survival following focal cerebral ischemia: life and death struggle in the penumbra. *J Neuropathol Exp Neurol* 2003; **62**: 329–339.
7. Cao G, Minami M, Pei W, Yan C, Chen D, O'Horo C et al. Intracellular Bax translocation after transient cerebral ischemia: implications for a role of the mitochondrial apoptotic signaling pathway in ischemic neuronal death. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001; **21**: 321–333.
8. Er E, Oliver L, Cartron PF, Juin P, Manon S, Vallette FM. Mitochondria as the target of the pro-apoptotic protein Bax. *Biochim Biophys Acta* 2006; **1757**: 1301–1311.
9. Zhang Y, Cho CH, Atchaneeyasakul LO, McFarland T, Appukuttan B, Stout JT. Activation of the mitochondrial apoptotic pathway in a rat model of central retinal artery occlusion. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005; **46**: 2133–2139.
10. Linseman DA, Butts BD, Precht TA, Phelps RA, Le SS, Laessig TA et al. Glycogen synthase kinase-3beta phosphorylates Bax and promotes its mitochondrial localization during neuronal apoptosis. *J Neurosci* 2004; **24**: 9993–10002.
11. Hetz C, Vitte PA, Bombrun A, Rostovtseva TK, Montessuit S, Hiver A et al. Bax channel inhibitors prevent mitochondrion-mediated apoptosis and protect neurons in a model of global brain ischemia. *J Biol Chem* 2005; **280**: 42960–42970.
12. Graham SH, Chen J. Programmed cell death in cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001; **21**: 99–109.
13. Chen J, Graham SH, Chan PH, Lan J, Zhou RL, Simon RP. bcl-2 is expressed in neurons that survive focal ischemia in the rat. *Neuroreport* 1995; **6**: 394–398.
14. Chen J, Graham SH, Nakayama M, Zhu RL, Jin K, Stetler RA et al. Apoptosis repressor genes Bcl-2 and Bcl-x-long are expressed in the rat brain following global ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 1997; **17**: 2–10.
15. Cao G, Pei W, Ge H, Liang Q, Luo Y, Sharp FR et al. In vivo delivery of a Bcl-xL fusion protein containing the TAT protein transduction domain protects against ischemic brain injury and neuronal apoptosis. *J Neurosci* 2002; **22**: 5423–5431.
16. Lawrence MS, Ho DY, Sun GH, Steinberg GK, Sapolsky RM. Overexpression of Bcl-2 with herpes simplex virus vectors protects CNS neurons against neurological insults in vitro and in vivo. *J Neurosci* 1996; **16**: 486–496.
17. Sun Y, Jin K, Clark KR, Peel A, Mao XO, Chang Q et al. Adeno-associated virus-mediated delivery of BCL-w gene improves outcome after transient focal cerebral ischemia. *Gene Therapy* 2003; **10**: 115–122.
18. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathol* 2007; **35**: 495–516.
19. Youle RJ, Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; **9**: 47–59.
20. Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Chipuk JE, Bonzon C, Sullivan BA, Green DR et al. BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly. *Mol Cell* 2005; **17**: 525–535.
21. Chen L, Willis SN, Wei A, Smith BJ, Fletcher JI, Hinds MG et al. Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Mol Cell* 2005; **17**: 393–403.
22. Plesnila N, Zinkel S, Le DA, Amin-Hanjani S, Wu Y, Qiu J et al. BID mediates neuronal cell death after oxygen/glucose deprivation and focal cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; **98**: 15318–15323.
23. Yin X, M, Luo Y, Cao G, Bai L, Pei W, Kuharsky DK et al. Bid-mediated mitochondrial pathway is critical to ischemic neuronal apoptosis and focal cerebral ischemia. *J Biol Chem* 2002; **277**: 42074–42081.
24. Kuroki K, Virard I, Concannon CG, Engel T, Woods I, Taki W et al. Effects of transient focal cerebral ischemia in mice deficient in puma. *Neurosci Lett* 2009; **451**: 237–240.
25. Inta I, Paxian S, Maegele I, Zhang W, Pizzi M, Spano P et al. Bim and Noxa are candidates to mediate the deleterious effect of the NF-kappa B subunit RelA in cerebral ischemia. *J Neurosci* 2006; **26**: 12896–12903.
26. Shibue T, Suzuki S, Okamoto H, Yoshida H, Ohba Y, Takaoka A et al. Differential contribution of Puma and Noxa in dual regulation of p53-mediated apoptotic pathways. *EMBO J* 2006; **25**: 4952–4962.
27. Oda E, Ohki R, Murasawa H, Nemoto J, Shibue T, Yamashita T et al. Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* 2000; **288**: 1053–1058.
28. Puthalakath H, Villunger A, O'Reilly LA, Beaumont JG, Coultas L, Cheney RE et al. Bmf: a proapoptotic BH3-only protein regulated by interaction with the myosin V actin motor complex, activated by anoikis. *Science* 2001; **293**: 1829–1832.
29. Hausmann M, Leucht K, Ploner C, Kiessling S, Villunger A, Becker H et al. BCL-2 modifying factor (BMF) is a central regulator of anoikis in human intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* 2011; **286**: 26533–26540.
30. Grespi F, Soratroi C, Krumschnabel G, Sohm B, Ploner C, Geley S et al. BH3-only protein Bmf mediates apoptosis upon inhibition of CAP-dependent protein synthesis. *Cell Death Differ* 2010; **17**: 1672–1683.
31. Kilbride S, M, Farrelly AM, Bonner C, Ward MW, Nyhan KC, Concannon CG et al. AMP-activated protein kinase mediates apoptosis in response to bioenergetic stress through activation of the pro-apoptotic Bcl-2 homology domain-3-only protein BMF. *J Biol Chem* 2010; **285**: 36199–36206.
32. Labi V, Erlacher M, Kiessling S, Manzl C, Frenzel A, O'Reilly L et al. Loss of the BH3-only protein Bmf impairs B cell homeostasis and accelerates gamma irradiation-induced thymic lymphoma development. *J Exp Med* 2008; **205**: 641–655.



33. Contreras A, U, Mebratu Y, Delgado M, Montano G, Hu CA, Ryter SW *et al*. Deacetylation of p53 induces autophagy by suppressing Bmf expression. *J Cell Biol* 2013; **201**: 427–437.
34. Ramirez-Peinado S, Alcázar-Limones F, Lagares-Tena L, El Mijad N, Caro-Maldonado A, Tirado OM *et al*. 2-Deoxyglucose induces Noxa-dependent apoptosis in alveolar rhabdomyosarcoma. *Cancer Res* 2011; **71**: 6796–6806.
35. Kim JY, Ahn HJ, Ryu JH, Suk K, Park JH. BH3-only protein Noxa is a mediator of hypoxic cell death induced by hypoxia-inducible factor 1alpha. *J Exp Med* 2004; **199**: 113–124.
36. Ploner C, Kofler R, Villunger A. Noxa: at the tip of the balance between life and death. *Oncogene* 2008; **27**(Suppl 1): S84–S92.
37. D'Orsi B, Bonner H, Tuffy LP, Dussmann H, Woods I, Courtney MJ *et al*. Calpains are downstream effectors of bax-dependent excitotoxic apoptosis. *J Neurosci* 2012; **32**: 1847–1858.
38. Pike BR, Flint J, Dave JR, Lu XC, Wang KK, Tortella FC *et al*. Accumulation of calpain and caspase-3 proteolytic fragments of brain-derived alphaII-spectrin in cerebral spinal fluid after middle cerebral artery occlusion in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 2004; **24**: 98–106.
39. Newcomb-Fernandez JK, Zhao X, Pike BR, Wang KK, Kampfl A, Beer R *et al*. Concurrent assessment of calpain and caspase-3 activation after oxygen-glucose deprivation in primary septo-hippocampal cultures. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001; **21**: 1281–1294.
40. Morimoto T, Ginsberg MD, Dietrich WD, Zhao W. Hyperthermia enhances spectrin breakdown in transient focal cerebral ischemia. *Brain Res* 1997; **746**: 43–51.
41. Nakajima E, Hammond KB, Rosales JL, Shearer TR, Azuma M. Calpain, not caspase, is the causative protease for hypoxic damage in cultured monkey retinal cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011; **52**: 7059–7067.
42. Carmichael ST. Rodent models of focal stroke: size, mechanism, and purpose. *NeuroRx* 2005; **2**: 396–409.
43. Dias N, Stein CA. Antisense oligonucleotides: basic concepts and mechanisms. *Mol Cancer Ther* 2002; **1**: 347–355.
44. Michalak EM, Villunger A, Adams JM, Strasser A. In several cell types tumour suppressor p53 induces apoptosis largely via Puma but Noxa can contribute. *Cell Death Differ* 2008; **15**: 1019–1029.
45. Ness J. M, Harvey CA, Strasser A, Bouillet P, Klocke BJ, Roth KA. Selective involvement of BH3-only Bcl-2 family members Bim and Bad in neonatal hypoxia-ischemia. *Brain Res* 2006; **1099**: 150–159.
46. Puthalakath H, Huang DC, O'Reilly LA, King SM, Strasser A. The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. *Mol Cell* 1999; **3**: 287–296.
47. Lo KW, Naisbitt S, Fan JS, Sheng M, Zhang M. The 8-kDa dynein light chain binds to its targets via a conserved (K/R)XTQT motif. *J Biol Chem* 2001; **276**: 14059–14066.
48. Saito A, Hayashi T, Okuno S, Ferrand-Drake M, Chan P. H. Overexpression of copper/zinc superoxide dismutase in transgenic mice protects against neuronal cell death after transient focal ischemia by blocking activation of the Bad cell death signaling pathway. *J Neurosci* 2003; **23**: 1710–1718.
49. Gao Y, Signore AP, Yin W, Cao G, Yin XM, Sun F *et al*. Neuroprotection against focal ischemic brain injury by inhibition of c-Jun N-terminal kinase and attenuation of the mitochondrial apoptosis-signaling pathway. *J Cereb Blood Flow Metab* 2005; **25**: 694–712.
50. Erlacher M, Labi V, Manzi C, Böck G, Tzankov A, Häcker G *et al*. Puma cooperates with Bim, the rate-limiting BH3-only protein in cell death during lymphocyte development, in apoptosis induction. *J Exp Med* 2006; **203**: 2939–2951.
51. Villunger A, Michalak EM, Coultas L, Müllauer F, Böck G, Ausserlechner MJ *et al*. p53- and drug-induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins puma and noxa. *Science* 2003; **302**: 1036–1038.
52. Concannon CG, Tuffy LP, Weisová P, Bonner HP, Dávila D, Bonner C *et al*. AMP kinase-mediated activation of the BH3-only protein Bim couples energy depletion to stress-induced apoptosis. *J Cell Biol* 2010; **189**: 83–94.
53. Goetze B, Grunewald B, Baldassa S, Kiebler M. Chemically controlled formation of a DNA/calcium phosphate coprecipitate: application for transfection of mature hippocampal neurons. *J Neurobiol* 2004; **60**: 517–525.
54. Rytter A, Cronberg T, Asztely F, Nemali S, Wieloch T. Mouse hippocampal organotypic tissue cultures exposed to in vitro 'ischemia' show selective and delayed CA1 damage that is aggravated by glucose. *J Cereb Blood Flow Metab* 2003; **23**: 23–33.
55. Murakami K, Kondo T, Kawase M, Chan PH. The development of a new mouse model of global ischemia: focus on the relationships between ischemia duration, anesthesia, cerebral vasculature, and neuronal injury following global ischemia in mice. *Brain Res* 1998; **780**: 304–310.
56. Culmsee C, Zhu C, Landshamer S, Becattini B, Wagner E, Pellecchia M *et al*. Apoptosis-inducing factor triggered by poly(ADP-ribose) polymerase and Bid mediates neuronal cell death after oxygen-glucose deprivation and focal cerebral ischemia. *J Neurosci* 2005; **25**: 10262–10272.
57. Plesnila N, Zhu C, Culmsee C, Gröger M, Moskowitz MA, Blomgren K. Nuclear translocation of apoptosis-inducing factor after focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2004; **24**: 458–466.



**Cell Death and Disease** is an open-access journal published by **Nature Publishing Group**. This work is licensed under a **Creative Commons Attribution 4.0 International Licence**. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons licence, users will need to obtain permission from the licence holder to reproduce the material. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>